



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202045530 A

(43)公開日：中華民國 109 (2020) 年 12 月 16 日

(21)申請案號：109103419

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 02 月 04 日

(51)Int. Cl. : C07K14/47 (2006.01)

C12N15/86 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

(30)優先權：2019/02/04 美國

62/800,911

(71)申請人：美國全美兒童醫院之研究學會 (美國) RESEARCH INSTITUTE AT NATIONWIDE CHILDREN'S HOSPITAL (US)

美國

美國俄亥俄州創新基金會 (美國) OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION (US)

美國

(72)發明人：梅爾 凱瑟琳 MEYER, KATHRIN (CH) ; 卡斯帕 布萊恩 K KASPAR, BRIAN K. (US) ; 福斯特 凱文 FOUST, KEVIN (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：71 項 圖式數：38 共 120 頁

(54)名稱

腺相關病毒對 CLN3 聚核苷酸的遞送

(57)摘要

本揭示案係關於重組腺相關病毒(rAAV)對蠟樣脂褐質沈積症神經元 3(CLN3)聚核苷酸的遞送。本揭示案提供了 rAAV 及使用所述 rAAV 對神經元蠟樣脂褐質沈積症或 CLN3 型巴騰病進行 CLN3 基因療法的方法。

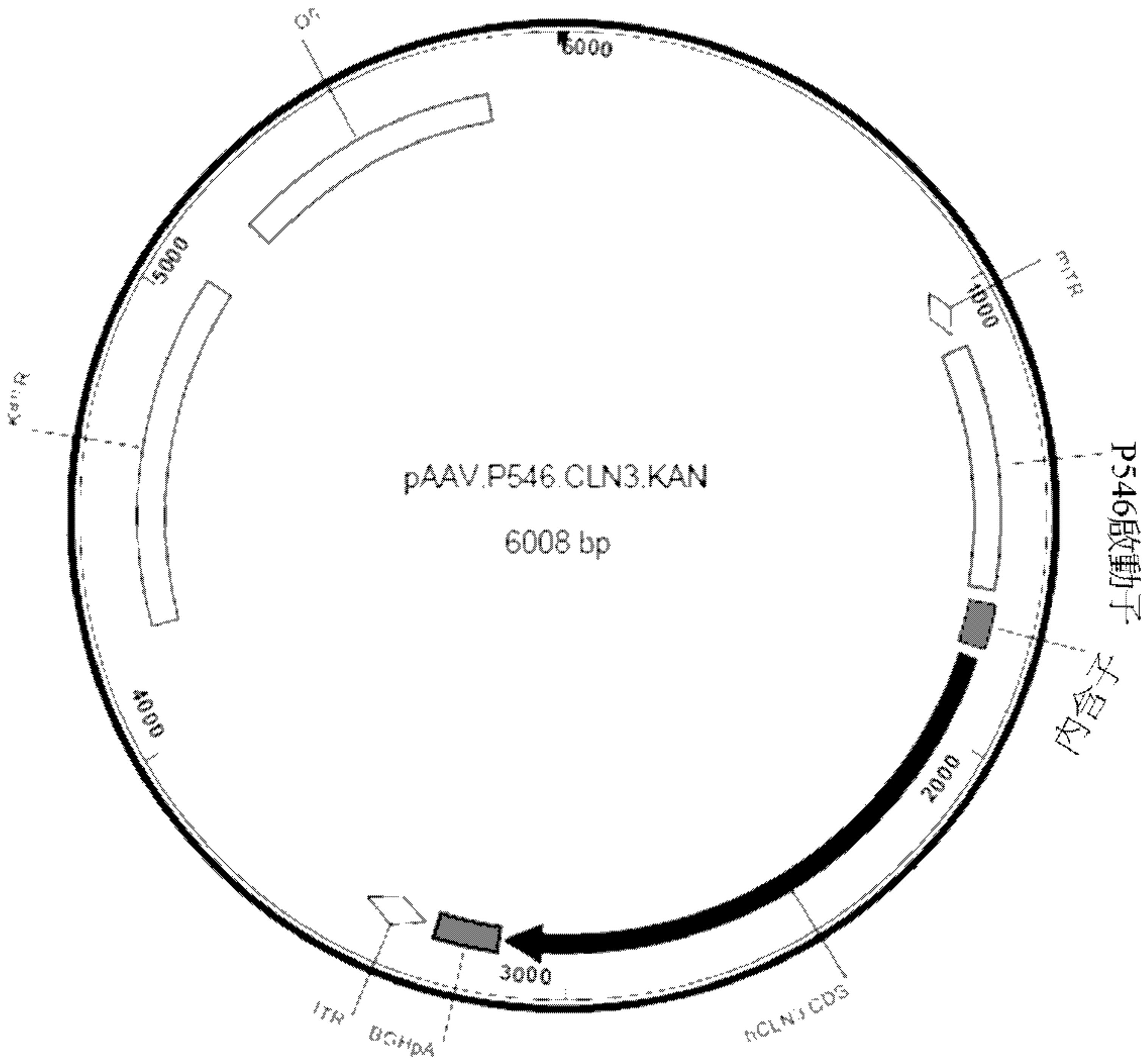
The present disclosure relates to recombinant adeno-associated virus (rAAV) delivery of a ceroid lipofuscinosis neuronal 3 (CLN3) polynucleotide. The disclosure provides rAAV and methods of using the rAAV for CLN3 gene therapy of the neuronal ceroid lipofuscinosis or CLN3-Batten Disease.

指定代表圖：

A



B



【圖1】



202045530

【發明摘要】

【中文發明名稱】

腺相關病毒對CLN3聚核苷酸的遞送

【英文發明名稱】

ADENO-ASSOCIATED VIRUS DELIVERY OF CLN3
POLYNUCLEOTIDE

【中文】

本揭示案係關於重組腺相關病毒(rAAV)對蠟樣脂褐質沈積症神經元3(CLN3)聚核苷酸的遞送。本揭示案提供了rAAV及使用所述rAAV對神經元蠟樣脂褐質沈積症或CLN3型巴滕病進行CLN3基因療法的方法。

【英文】

The present disclosure relates to recombinant adeno-associated virus (rAAV) delivery of a ceroid lipofuscinosis neuronal 3 (CLN3) polynucleotide. The disclosure provides rAAV and methods of using the rAAV for CLN3 gene therapy of the neuronal ceroid lipofuscinosis or CLN3-Batten Disease.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

腺相關病毒對CLN3聚核苷酸的遞送

【英文發明名稱】

ADENO-ASSOCIATED VIRUS DELIVERY OF CLN3
POLYNUCLEOTIDE

【技術領域】

【0001】 本揭示案係關於對蠟樣脂褐質沈積症神經元3(CLN3)聚核苷酸的重組腺相關病毒(rAAV)遞送。本揭示案提供了rAAV及使用rAAV用於神經元蠟樣脂褐質沈積症(NCL)或CLN3型巴藤病的CLN3基因療法的方法。

【先前技術】

【0002】 神經元蠟樣脂褐質沈積症(NCL)係一組嚴重的神經退行性疾病。

【0003】 CLN3基因的突變導致幼年NCL或CLN3型巴藤病(CLN3-Batten Disease)(Kitzmü 等人，《人類分子遺傳學(Human Molecular Genetics)》2008；17(2):303-312；Munroe等人，《美國人類遺傳學期刊(Am J Hum Genet.)》1997；61:310-316)，亦被稱為Spielmeyer-Sjogren-Vogt病。突變干擾溶酶體存儲清除過程。此時，已經描述了67種引起疾病的突變。然而，85%的患者係1.02 kb缺失的同型接合子，導致外顯子7及外顯子8的缺失。在患者中發現的CLN3突變主要導致蛋白質(battenin)的豐度或功能降低。

【0004】 CLN3型巴藤病的典型發病年齡在4歲至7歲之間，具有潛

在的但快速進展的視力喪失。患有幼年NCL的兒童在幾個月內從視力正常到失明，但在幾年之後可以保持光暗感。認知及運動衰退通常在接下來(7歲至10歲)伴隨行為問題，如好鬥性(8歲至10歲)，並且接著癲癇發作(10歲至12歲)。帕金森病的特徵發展在11歲至13歲之間。在疾病的後期階段，已經報導了個體中的心臟傳導異常。在患有CLN3型巴藤病的個體中存在高表型變異性，但是所有患者都具有共同的低視力或進行性失明。此外，已經在82名患者中驗證的統一巴藤病評定量表(UBDRS)的物理分量表示出了每年穩定並且可測量的下降2.86點(2.27至3.45， $p < 0.0001$)。從症狀發作到壽命結束，平均存活期通常為15年。

【0005】 CLN3型巴藤病的治療措施範圍廣泛，旨在努力減輕疾病。此等包含如靶向AMPA受體的EGIS-8332及他侖帕奈(talampanel)等藥物療法；允許通讀過早停止突變的藥物；有助於分解聚集的存儲材料(半胱胺酒石酸氫鹽(cystagon)/半胱胺(cysteamine))的藥物；以及甚至免疫抑制療法(黴酚酸酯(mycophenolate)、潑尼松龍(prednisolone))。亦評估了酶替代及幹細胞療法。雖然已經研究了許多治療方法，但很少有人臨床環境中進行評估。沒有可用於減緩進展或治癒疾病。患者及家屬依靠治療來改善症狀及姑息治療。

【0006】 $Cln3^{\Delta ex7/8}$ 小鼠模型建立於21世紀初，模仿CLN3型巴藤病患者中最常見的致病突變：從CLN3基因中消除了外顯子7及8的大約1 kb突變(Cotman等人，《人類分子遺傳學》2002；11(22):2709-2721；Mole等人，《歐洲兒科神經學期刊(Eur J Paediatr Neurol.)》2001；5:7-10)。所述突變在85%的患者中以同型接合方式發現，並且在另外15%的患者中作為雜合突變與另一個等位基因上的點突變組合發現。預測外顯子丟失會

產生移碼突變，導致截斷的蛋白質產物活性喪失或降低(Lerner等人，《細胞(Cell)》1995年9月22日；82(6):949-57)；Kitzmüller等人，《人類分子遺傳學》2008年1月15日；17(2):303-12)。在他們最初的研究中，Cotman等人證明了CLN3^{Δex7/8}小鼠模型成功地概括了CLN3疾病的幾個方面。CLN3^{Δex7/8}動物在不同時間點在神經系統中聚集自發螢光存儲材料及ATP合酶亞單位C，並且在10月齡時開始在腦中展示出星形膠質細胞反應性。隨後的研究詳述了小腦中麩胺酸受體功能的改變，與加速旋轉棒測定中的運動缺陷相對應(Cotman等人，《人類分子遺傳學》2002；11(22):2709-2721)。在行為方面，Cln3^{Δex7/8}小鼠已經在年輕及成熟時間點進行了表徵，其中在初生的及年輕成年小鼠中觀察到神經發育運動遲緩，並且在10月齡至12月齡時觀察到步態及後肢緊扣的缺陷(Cotman等人，《人類分子遺傳學》2002；11(22):2709-2721；Osório等人，《基因大腦及行為(Genes Brain Behav.)》2009年4月；8(3):337-345)。CLN3^{Δex7/8}小鼠似乎沒有顯現出功能性視覺障礙，但與12月齡的小鼠對照相比存在輕微的存活缺陷(Cotman等人，《人類分子遺傳學》2002；11(22):2709-2721；Seigel等人，《分子及細胞神經科學(Mol Cell Neurosci.)》2002年4月；19(4):515-27)。總之，攜帶最常見人類突變的Cln3^{Δex7/8}小鼠模型展現出與CLN3型巴藤病一致的許多細胞及行為變化，使其成為用於測試療法的合適模型。

【0007】 因此，本領域仍然有治療CLN3型巴藤病的需求。

【發明內容】

【0008】 本文提供了使用重組AAV進行CLN3基因療法的方法及產品。

【0009】 本文提供了編碼CLN3多肽的重組腺相關病毒9(rAAV9)，其包括rAAV9基因組，所述rAAV9基因組以5'至3'的順序包括：P546啟動子及編碼所述CLN3多肽的聚核苷酸。在一些實施例中，所述rAAV9基因組包括自身互補型基因組。在一些實施例中，所述rAAV9基因組包括單股基因組。

【0010】 提供了自身互補行重組腺相關病毒9(scAAV9)，其編碼SEQ ID NO: 1中所示的CLN3多肽，其中所述scAAV9的基因組以5'至3'的順序包括：第一AAV末端反向重複；包括SEQ ID NO: 3的序列的P546啟動子；編碼SEQ ID NO: 1中所示的CLN3多肽的聚核苷酸；以及第二AAV末端反向重複。編碼所述CLN3多肽的所述聚核苷酸可以與SEQ ID NO: 2至少90%一致。

【0011】 亦提供了具有以5'至3'的順序包括以下的基因組的scAAV9：第一AAV末端反向重複；包括SEQ ID NO: 3的序列的P546啟動子；SV40內含子；編碼SEQ ID NO: 1的所述CLN3多肽的聚核苷酸；以及第二AAV末端反向重複；具有以5'至3'的順序包括以下的基因組的scAAV9：第一AAV末端反向重複；包括SEQ ID NO: 3的序列的P546啟動子；編碼SEQ ID NO: 1的所述CLN3多肽的聚核苷酸；牛生長激素聚腺苷酸化poly A序列；以及第二AAV末端反向重複。在示例性實施例中，所述scAAV9具有包括SEQ ID NO: 4中所示基因匣的基因組。

【0012】 提供了單股重組腺相關病毒9(ssAAV9)，其編碼SEQ ID NO: 1中所示的CLN3多肽，其中所述ssAAV9的基因組以5'至3'的順序包括：第一AAV末端反向重複；包括SEQ ID NO: 3的序列的P546啟動子；編碼SEQ ID NO: 1中所示的CLN3多肽的聚核苷酸；以及第二AAV末端反

向重複。編碼所述CLN3多肽的所述聚核苷酸可以與SEQ ID NO: 2至少90%一致。亦提供了具有以5'至3'的順序包括以下的基因組的ssAAV9：第一AAV末端反向重複；包括SEQ ID NO: 3的序列的P546啟動子；SV40內含子；編碼SEQ ID NO: 1的所述CLN3多肽的聚核苷酸；以及第二AAV末端反向重複；具有以5'至3'的順序包括以下的基因組的ssAAV9：第一AAV末端反向重複；包括SEQ ID NO: 3的序列的P546啟動子；編碼SEQ ID NO: 1的所述CLN3多肽的聚核苷酸；牛生長激素聚腺苷酸化poly A序列；以及第二AAV末端反向重複。

【0013】 SEQ ID NO: 4所示的核酸序列係圖1A中提供的基因匣。提供了具有scAAV9基因組或ssAAV9基因組的rAAV9，其包括與SEQ ID NO: 4的核酸序列至少90%一致、或與SEQ ID NO: 4的核酸序列至少95%一致、或與SEQ ID NO: 4的核酸序列至少98%一致的核酸序列。

【0014】 亦提供了包括以下的核酸分子：第一AAV末端反向重複；包括SEQ ID NO: 3的序列的P546啟動子；編碼SEQ ID NO: 1的CLN3多肽的核酸序列；以及第二AAV末端反向重複。在一些實施例中，編碼所述CLN3多肽的所述聚核苷酸與SEQ ID NO: 2至少90%一致。

【0015】 亦提供了包括以下的核酸分子：第一AAV末端反向重複；包括SEQ ID NO: 3的核苷酸序列的P546啟動子；SV40內含子；編碼SEQ ID NO: 1的所述CLN3多肽的核酸序列；以及第二AAV末端反向重複。另外提供了包括以下的聚核苷酸：第一AAV末端反向重複；包括SEQ ID NO: 3的核苷酸序列的P546啟動子；編碼SEQ ID NO: 1的所述CLN3多肽的核酸序列；牛生長激素聚腺苷酸化poly A序列；以及第二AAV末端反向重複。在提供的任何聚核苷酸中，所述CLN3多肽可以由SEQ ID NO: 2中

示出的核酸序列或與SEQ ID NO: 2至少90%一致的序列編碼。

【0016】 提供了包括任何聚核苷酸的rAAV9、scAAV9或ssAAV9。亦提供了具有單股基因組的rAAV。

【0017】 進一步提供了編碼CLN3多肽的rAAV9病毒顆粒，其中rAAV9基因組以5'至3'的順序包括：第一AAV末端反向重複；包括與SEQ ID NO: 3至少90%一致的核酸序列的P546啟動子；編碼與SEQ ID NO: 1的胺基酸序列至少90%一致的CLN3多肽的聚核苷酸；以及第二AAV末端反向重複。提供的rAAV9顆粒可以包括編碼CLN3多肽的聚核苷酸，其包括與SEQ ID NO: 1至少90%一致的胺基酸序列。另外，rAAV9病毒顆粒可以包括AAV9基因組，其包括與SEQ ID NO: 4的序列至少90%一致、與SEQ ID NO: 4的核酸序列至少95%一致、或與SEQ ID NO: 4的核酸序列至少98%一致的核酸序列。任何rAAV9病毒顆粒可以進一步包括SV40內含子及/或BGH poly-A序列。

【0018】 在所提供的任何rAAV、ssAAV及scAAV中，AAV末端反向重複可為AAV2末端反向重複。

【0019】 亦提供了包括rAAV9基因組的核酸分子，其以5'至3'的順序包括：第一AAV末端反向重複；包括與SEQ ID NO: 3至少90%一致的核酸序列的P546啟動子；以及編碼與SEQ ID NO: 1的胺基酸序列至少90%一致的CLN3多肽的聚核苷酸。所提供的核酸分子可以包括自身互補型基因組或單股基因組。

【0020】 進一步提供了包括rAAV9基因組的核酸分子，其以5'至3'的順序包括：第一AAV末端反向重複；包括與SEQ ID NO: 3至少90%一致的核酸序列的P546啟動子；編碼與SEQ ID NO: 1的胺基酸序列至少

90%一致的CLN3多肽的聚核苷酸；以及第二AAV末端反向重複。所提供的核酸分子可以包括編碼CLN3多肽的聚核苷酸，其包括與SEQ ID NO: 1的胺基酸序列至少90%一致的胺基酸序列。另外，核酸分子可以包括AAV9基因組，其包括與SEQ ID NO: 4的序列至少90%一致、與SEQ ID NO: 4的核酸序列至少95%一致、與SEQ ID NO: 4的核酸序列至少98%一致的核酸序列。提供的任何核酸分子可以進一步包括SV40內含子及/或BGH poly-A序列。

【0021】進一步提供了包括以下的組合物：本文所描述的scAAV9、本文所描述的ssAAV9、本文所描述的核酸分子或本文所描述的rAAV病毒顆粒以及至少一種藥學上可接受之賦形劑。在一些情況下，藥學上可接受之賦形劑包括非離子低滲透化合物、緩衝液、聚合物、鹽或其組合。在一些實施例中，所述聚合物係共聚物。在一些實施例中，所述共聚物係泊洛沙姆。例如，所述組合物可以至少包括藥學上可接受之賦形劑，其包括非離子低滲透化合物。例如藥學上可接受之賦形劑包括約20%至40%的非離子的、低滲化合物或約25%至約35%非離子低滲透化合物。一種示例性組合物包括調配於20 mM Tris(pH 8.0)、1 mM MgCl₂、200 mM NaCl、0.001%泊洛沙姆188及約25%至約35%非離子低滲透化合物中的scAAV。另一種示例性組合物包括在1X PBS及0.001%普郎尼克F68中調配的scAAV。

【0022】仍進一步提供治療受試者之CLN3型巴藤病的方法，所述方法包括向受試者投與包括治療有效量之以下各項的組合物：本文揭示的任何rAAV9病毒顆粒、本文揭示的任何scAAV9、本文揭示的任何ssAAV9的組合物、本文所描述的任何核酸分子或本文所描述的任何組合物。

【0023】 在所提供的任何方法中，組合物 rAAV9、ssAAV9、scAAV9 及/或核酸分子藉由選自由以下組成之群的途徑投與：鞘內、腦室內、腦實質內、靜脈內及其組合。

【0024】 治療有效量之本文揭示的任何 rAAV9 病毒顆粒、本文揭示的任何 scAAV9、本文揭示的任何 ssAAV9、本文所描述的任何核酸分子或本文所描述的任何組合物的用途，其用於製備供治療有需要之受試者之 CLN3 型巴藤病的藥物。

【0025】 亦提供了包括治療有效量之以下各項的組合物：本文揭示的任何 rAAV9 病毒顆粒、本文揭示的任何 scAAV9、本文揭示的任何 ssAAV9 的組合物、本文所描述的任何核酸分子或所描述的用於治療有需要之受試者之 CLN3 型巴藤病的任何組合物。

【0026】 藉由鞘內途徑投與的 scAAV9、ssAAV9 或 rAAV9 的示例性劑量係每個受試者約 1×10^{11} vg 的 scAAV9、ssAAV9 或 rAAV9 病毒顆粒至約 2×10^{15} vg；或每個受試者約 1×10^{11} vg 的 scAAV9、ssAAV9 或 rAAV9 病毒顆粒至每個受試者約 1×10^{15} vg 的 scAAV9、ssAAV9 或 AAV9 病毒顆粒；或每個受試者約 1×10^{12} vg 的 scAAV9、ssAAV9 或 rAAV9 病毒顆粒至每個受試者約 1×10^{14} vg 的 scAAV9、ssAAV9 或 AAV9 病毒顆粒；或每個受試者約 1×10^{12} vg 的 scAAV9、ssAAV9 或 rAAV9 病毒顆粒至每個受試者約 1×10^{15} vg 的 scAAV9、ssAAV9 或 AAV9 病毒顆粒。例如，向受試者投與約 1×10^{13} vg 的 scAAV9、ssAAV9 或 AAV9 病毒顆粒；或向受試者投與約 1.5×10^{13} 的 scAAV9、ssAAV9 或 AAV9 病毒顆粒；或向受試者投與約 3.4×10^{13} 的 scAAV9、ssAAV9 或 AAV9 病毒顆粒；或向受試者投與約 6×10^{13} vg 的 scAAV9、ssAAV9 或 AAV9 病毒顆粒；或向受試者投與約

1.2×10¹⁴的scAAV9、ssAAV9或AAV9病毒顆粒；或向受試者投與約2×10¹⁴的scAAV9、ssAAV9或AAV9病毒顆粒。

【0027】 與治療前的受試者或未治療的CLN3-巴滕病患者相比，用於治療的所述方法、藥物或組合物使受試者出現以下中的一者或多者：(a)自發螢光儲存材料的溶酶體聚集減少或減緩，(b)ATP合成酶亞單位C的溶酶體聚集減少或減緩，(c)膠質細胞活化(星形膠質細胞及/或小膠質細胞)活化減少或減緩，(d)星形細胞增生減少或減緩，(e)藉由MRI測量的腦量損失減少或減緩，(f)癲癇發作減少或減緩，以及(g)用於評估CLN3巴滕病進展及/或改善之量表(例如統一巴滕病評定系統(UBDRS)評估量表或漢堡運動(Hamburg Motor)及語言量表)中的一項或多項穩定、進展減少或減緩，或改善。在投與rAAV9、ssAAV9或本文揭示的scAAV或核酸分子後，受試者可以保持在特倫德倫伯格位置。

【0028】 仍進一步提供了治療有需要之患者之CLN3疾病的方法，所述方法包括將包括以下的組合物遞送至有需要之患者的腦或脊髓：本文提供的任何一種rAAV病毒、本文揭示的任何scAAV9、本文揭示的任何ssAAV9、本文所描述的任何核酸分子、本文所描述的任何組合物或本文所描述的任何藥物。

【0029】 在所提供的任何方法或用途中，組合物或藥物可以藉由鞘內、腦室內、腦實質內或靜脈內注射或其組合來遞送。所提供的任何方法可以進一步包括在鞘內注射組合物、rAAV9病毒顆粒或scAAV或本文揭示的核酸分子後將患者置於特倫德倫伯格位置。

【0030】 在所提供的任何方法或用途中，所述組合物或藥物可以包括非離子低滲透造影劑。例如，所述組合物包括非離子低滲透造影劑，其

中所述非離子低滲透造影劑選自由以下組成之群：碘比醇(iobitridol)、碘海醇(iohexol)、碘美普爾(iomeprol)、碘帕醇(iopamidol)、碘噴托(iopentol)、碘普胺(iopromide)、碘佛醇(ioversol)、碘昔蘭(ioxilan)及其組合。

【0031】 投與的所述組合物或藥物可以包括藥學上可接受之賦形劑。例如，藥學上可接受之賦形劑包括約20%至40%的非離子的、低滲化合物或約25%至約35%非離子低滲透化合物。一種示例性組合物包括調配於20 mM Tris(pH為8.0)、1 mM MgCl₂、200 mM NaCl、0.001%泊洛沙姆188及約25%至約35%非離子低滲透化合物中的scAAV。另一種示例性組合物包括在1X PBS及0.001%普郎尼克F68中調配的scAAV。

【0032】 在所提供的任何方法或用途中，在將所述組合物或藥物遞送至所述腦或脊髓時，可以向腦幹、或向小腦、或可以向視覺皮質、或可以將所述組合物遞送至運動皮質。另外，在所提供的任何方法或用途中，在將所述組合物或藥物遞送至腦或脊髓時，可以將所述組合物遞送至神經細胞、神經膠質細胞或兩者。例如，其中遞送至腦或脊髓包括遞送至神經系統的細胞，如神經元、下運動神經元、小神經膠質細胞、少突膠質細胞、星形膠質細胞、許旺氏細胞或其組合。

【0033】 與治療前的受試者或未治療的受試者相比，所述組合物或藥物的方法、用途或投與使得受試者出現以下中的一者或多者：(a)自發螢光儲存材料的溶酶體聚集減少或減緩，(b)ATP合成酶亞單位C的溶酶體聚集減少或減緩，(c)膠質細胞活化(星形膠質細胞及/或小膠質細胞)活化減少或減緩，(d)星形細胞增生減少或減緩，(e)藉由MRI測量的腦量損失減少或減緩，(f)癲癇發作減少或減緩，以及(g)用於評估CLN3巴藤病進展

及/或改善之量表(例如統一巴藤病評定系統(UBDRS)評估量表或漢堡運動及語言量表)中的一項或多項穩定、進展減少或減緩，或改善。

【0034】 本文的標題係為了方便讀者而非限制性的。

【0035】 本文中「可能/可以(may)」及「能夠(can)」的使用係描述申請專利範圍中包含的各種實施例，而非指申請專利範圍範圍的不確定性。

【圖式簡單說明】

【0036】 圖1提供了(圖1A)scAAV9.P546.CLN3基因匣及(圖1B)用於產生scAAV9.P546.CLN3之質體構建體pAAV.P546.CLN3.KAN的示意圖。將人類CLN3 cDNA在P546啟動子的控制下插入衍生自AAV2的倒置末端重複(ITR)結構之間。SV40內含子(人類CLN3 cDNA的上游)及牛生長激素聚腺苷酸化(BGH Poly A)終止子序列(人類CLN3 cDNA的下游)有助於 mRNA 加工及增強轉殖基因表現。質體構建體pAAV.P546.CLN3.KAN的序列示於SEQ ID NO: 5中。基因組包裝在AAV9衣殼蛋白中。

【0037】 圖2提供的影像顯示在注射scAAV9.P546.CLN3的CLN3^{Δex7/8}小鼠中存在人類CLN3轉錄物。

【0038】 圖3提供的圖表顯示注射scAAV9.P546.CLN3的CLN3^{Δex7/8}小鼠在注射後第2個月，ASM聚集較早減少。所有圖表上示出的y軸代表ASM聚集的總面積。黑色條代表野生型小鼠(WT-PBS)，淺灰色條代表注射PBS的CLN3^{Δex7/8}小鼠且深灰色條代表注射scAAV9.P546.CLN3的CLN3^{Δex7/8}小鼠。

【0039】 圖4提供注射scAAV9.P546.CLN3之CLN3^{Δex7/8}小鼠的圖

表，其示出了在注射PBS之野生型小鼠(「WT」)、注射PBS之CLN3^{Δex7/8}(「CLN3」)以及注射scAAV9.P546.CLN3之CLN3^{Δex7/8}(「CLN3-AAV」)的各種腦區域中注射後第4個月及第6個月，ASM的聚集顯著降低。

【0040】圖5提供的影像及圖表證明scAAV9.P546.CLN3的ICV投與減少4月齡及6月齡CLN3^{Δex7/8}小鼠腦中之粒線體蛋白ATP合酶亞單位C的異常溶酶體聚集。上圖中提供了對ATP合酶亞單位C染色並且在6個月時間點經由DAB染色可視化之冷凍組織切片的代表性影像。下圖中的圖表提供在注射後4個月(4M)及6個月(6M)在皮質之體覺1桶狀場(S1BF)、在注射後4個月及6個月以及在腹側後內側/腹側後外側核(VPM/VPL)注射PBS的WT(「WT」)、注射PBS的CLN3^{Δex7/8}(「CLN3」)以及注射scAAV9.P546.CLN3的CLN3^{Δex7/8}(「CLN3-AAV」)小鼠中亞單位C聚集的定量。在未治療的CLN3^{Δex7/8}與scAAV9.P546.CLN3治療的動物以及野生型動物之間， $N = 5$ ， $p \leq 0.0001$ 。在注射後4個月及6個月，S1BF中野生型與治療的CLN3^{Δex7/8}小鼠之間， $p \leq 0.5$ 。

【0041】圖6提供ICV投與scAAV9.P546.CLN3的影像及圖表，其使4月齡及6月齡CLN3^{Δex7/8}小鼠腦中的星形細胞增生減少。上圖：針對GFAP染色之固定組織切片的代表性影像(6個月時間點)作為活化星形膠質細胞的標記物並且經由DAB染色可視化。下圖：在注射後4個月及6個月，注射PBS的WT(「WT」)、注射PBS的CLN3^{Δex7/8}(「CLN3」)以及注射scAAV9.P546.CLN3的CLN3^{Δex7/8}(「CLN3-AAV」)小鼠中GFAP陽性面積的定量。對於每組及時間點而言， $N = 5$ 。S1BF = 桶狀皮質。VPM/VPL = 腹側後內側/腹側後外側核。

【0042】 圖7提供ICV投與scAAV9.P546.hCLN3的影像及圖表，其使4月齡及6月齡CLN3^{Δex7/8}小鼠腦中的小膠質細胞活化減少。上圖：針對CD68染色之固定組織切片的代表性影像(6個月時間點)作為活化小膠質細胞的標記物並且經由DAB染色可視化。下圖：在注射後4個月及6個月，注射PBS的WT(「WT」)、注射PBS的CLN3^{Δex7/8}(「CLN3」)以及注射scAAV9.P546.CLN3的CLN3^{Δex7/8}(「CLN3-AAV」)小鼠中CD68陽性面積的定量。對於每組及時間點，N = 5。S1BF = 桶狀皮質。VPM/VPL = 腹側後內側/腹側後外側核。

【0043】 圖8提供的圖表顯示注射後直至18個月的野生型及經PBS或治療之CLN3^{Δex7/8}小鼠的旋轉棒分析。所有小鼠不分性別(上圖)，僅雄性(中圖)，僅雌性(下圖)。

【0044】 圖9提供的圖顯示野生型及經PBS或scAAV9.P546.CLN3治療之CLN3^{Δex7/8}小鼠在達到18月齡時的莫里斯水迷宮效能。所有小鼠(上圖)，僅雄性(中圖)，僅雌性(下圖)。

【0045】 圖 10 提供的圖表顯示經 scAAV9.P546.CLN3 治療之 CLN3^{Δex7/8}小鼠及PBS治療之小鼠在爬桿分析中的效能。在爬桿測定中，將小鼠面朝上置放在垂直的桿子上，並且讓其隨著跌落的次數轉身及下降的時間來測量平衡及敏捷性。所有小鼠(上圖)，僅雄性(中圖)，僅雌性(下圖)。

【0046】 圖 11 提供的圖表顯示 scAAV9.P546.CLN3 治療的 CLN3^{Δex7/8}小鼠與PBS治療的CLN3^{Δex7/8}小鼠相比自垂直桿跌落較少。將小鼠面朝上置放在垂直桿上，並且在試圖轉身時測量跌落的次數，以測量平衡及敏捷性。所有小鼠(上圖)，僅雄性(中圖)，僅雌性(下圖)。

【0047】 圖12提供的影像顯示用scAAV9.P546.GFP注射後第三週，免疫螢光西方墨點法偵測各種腦區域以及外周小鼠組織中的GFP蛋白。

【0048】 圖 13 提供的圖表顯示在鞘內腰椎注射 3×10^{13} vg scAAV9.P546.CLN3後第12週，對人類CLN3在四年生食蟹猴之各種腦區域中之表現進行的逆轉錄定量PCR。將所述值相對於腰椎脊髓4至7中的CLN3蛋白含量歸一化。

【0049】 圖14提供scAAV9.P546.CLN3基因匣的核酸序列(SEQ ID NO: 4)。AAV2 ITR核酸序列以斜體顯示(5'ITR如SEQ ID NO: 6所示，並且3'ITR如SEQ ID NO: 9所示)，P546啟動子核酸序列(SEQ ID NO: 3)用單線標出下劃線，SV40內含子核酸序列(SEQ ID NO: 7)用雙線標出下劃線，人類CLN3 cDNA序列(SEQ ID NO: 2)的核酸序列用粗體表示，BGH polyA終止子的核酸序列(SEQ ID NO: 8)用虛線標出下劃線。

【0050】 圖15提供了全長AAV.P546.CLN3(SEQ ID NO: 5)的核酸序列。

【0051】 圖16提供了如qPCR所量測的，scAAV9.p546.CLN3治療導致*Cln3*^{Δ7/8}小鼠的大腦皮質及脊髓中hCLN3轉錄物表現量的增加，直至24個月大。平均值±SEM，每個月的普通單因素ANOVA，*p<0.05，**p<0.01，***p<0.001，****p<0.0001。

【0052】 圖 17 提供了如RNAscope(紅色螢光)所量測的，scAAV9.p546.CLN3治療在*Cln3*^{Δ7/8}小鼠的整個大腦中產生穩定的hCLN3轉錄物，直至24個月大。在20X下獲取圖像。

【0053】 圖18提供了資料，其展示scAAV9.p546.CLN3治療預防且減少*Cln3*^{Δ7/8}小鼠的大腦的兩個區域中的ASM累積，直至24個月大。平均

值± SEM，每個月的普通單因素ANOVA，* $p<0.05$ ，** $p<0.01$ ，*** $p<0.001$ ，**** $p<0.0001$ 。在20X下獲取圖像。

【0054】圖19提供了資料，其展示scAAV9.p546.CLN3治療預防在*Cln3*^{Δ7/8}小鼠的大腦的兩個區域中累積大量的子單位C(ASM的組分)，直至24個月大。平均值± SEM，每個月的普通單因素ANOVA，* $p<0.05$ ，** $p<0.01$ ，*** $p<0.001$ ，**** $p<0.0001$ 。在20X下獲取圖像。

【0055】圖20提供了資料，其展示scAAV9.p546.CLN3治療預防在*Cln3*^{Δ7/8}大腦的兩個區域中的星形細胞活化(GFAP+)，直至24個月大。平均值± SEM，每個月的普通單因素ANOVA，* $p<0.05$ ，** $p<0.01$ ，*** $p<0.001$ ，**** $p<0.0001$ 。在20X下獲取圖像。

【0056】圖21提供了資料，其展示視時間點而定，scAAV9.p546.CLN3治療預防在*Cln3*^{Δ7/8}大腦的兩個區域中的一些小神經膠質活化(CD68+)，直至24個月大。平均值± SEM，每個月的普通單因素ANOVA，* $p<0.05$ ，** $p<0.01$ ，*** $p<0.001$ ，**** $p<0.0001$ 。在20X下獲取圖像。

【0057】圖22提供了資料，其展示scAAV9.CB.CLN3治療在預防6及12月大的*Cln3*^{Δ7/8}小鼠的各種巴藤病病理方面係同樣有效的。平均值± SEM，普通雙因素ANOVA，* $p<0.05$ ，** $p<0.01$ ，*** $p<0.001$ ，**** $p<0.0001$ 。

【0058】圖23提供了資料，其展示*Cln3*^{Δ7/8}不具有紅血球異常，如直至24個月大所量測的。平均值± SEM，普通雙因素ANOVA。

【0059】圖24提供了資料，其展示*Cln3*^{Δ7/8}小鼠不具有白血球異常，如直至24個月大所量測的。平均值± SEM，普通雙因素ANOVA。

【0060】 圖25展示用scAAV9.p546.CLN3治療的小鼠在12個月大時顯示海馬體的CA3區域中的基於性別的不同程度的SubC累積。平均值± SEM，結合Tukey事後檢定的普通雙因素ANOVA，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，**** $p < 0.0001$ 。

【0061】 圖26展示scAAV9.p546.CLN3小鼠在多個時間點顯示在梨狀皮層(PIRC)中的基於性別的略微不同程度的SubC累積。平均值± SEM，結合Tukey事後檢定的普通雙因素ANOVA，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，**** $p < 0.0001$ 。

【0062】 圖27展示scAAV9.p546.CLN3小鼠在多個時間點顯示網狀丘腦核(RTN)中的基於性別的不同程度的SubC累積。平均值± SEM，結合Tukey事後檢定的普通雙因素ANOVA，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，**** $p < 0.0001$ 。

【0063】 圖28展示scAAV9.p546.CLN3小鼠在12個月時顯示體覺皮質中的基於性別的不同程度的SubC累積。平均值± SEM，結合Tukey事後檢定的普通雙因素ANOVA。* $p < 0.05$ 。 ** $p < 0.01$ 。 *** $p < 0.001$ 。 **** $p < 0.0001$ 。

【0064】 圖29展示scAAV9.p546.CLN3小鼠在12個月時顯示丘腦的VPM/VPL中的基於性別的不同程度的SubC累積。平均值± SEM，結合Tukey事後檢定的普通雙因素ANOVA，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，**** $p < 0.0001$ 。

【0065】 圖30展示scAAV9.p546.CLN3小鼠在12個月時顯示基側扁桃體(BLA)中的基於性別的不同程度的SubC累積。平均值± SEM，結合Tukey事後檢定的普通雙因素ANOVA，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，

*** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 。

【0066】 圖31提供scAAV9.p546.CLN3小鼠在12及18個月時顯示齒狀回(DG)的多形層中的基於性別的不同程度的SubC累積。平均值 $\pm$ SEM，結合Tukey事後檢定的普通雙因素ANOVA，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，**** $p < 0.0001$ 。

【0067】 圖32展示scAAV9.p546.CLN3小鼠在12及18個月時顯示韞(Hab)中的基於性別的不同程度的SubC累積。平均值 $\pm$ SEM，結合Tukey事後檢定的普通雙因素ANOVA，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，**** $p < 0.0001$ 。

【0068】 圖33提供了資料，其展示scAAV9.p546.CLN3小鼠在12及18個月時顯示背內側核(MD)中的基於性別的不同程度的SubC累積。平均值 $\pm$ SEM，結合Tukey事後檢定的普通雙因素ANOVA，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，**** $p < 0.0001$ 。

【0069】 圖34展示scAAV9.p546.CLN3小鼠顯示壓後皮質(RSC)中的基於性別的SubC累積程度沒有不同。平均值 $\pm$ SEM，結合Tukey事後檢定的普通雙因素ANOVA，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，**** $p < 0.0001$ 。

【0070】 圖35展示scAAV9.p546.CLN3小鼠在6個月時顯示體覺皮質(S1BF)中的基於性別的不同程度的活化小神經膠質細胞(CD68⁺)。平均值 $\pm$ SEM，結合Tukey事後檢定的普通雙因素ANOVA，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，**** $p < 0.0001$ 。

【0071】 圖36展示scAAV9.p546.CLN3小鼠顯示丘腦的VPM-VPL中的基於性別的不同程度的小神經膠質細胞(CD68⁺)活化。平均值 $\pm$

SEM，結合Tukey事後檢定的普通雙因素ANOVA， $*p<0.05$ ， $**p<0.01$ ， $***p<0.001$ ， $****p<0.0001$ 。

【0072】 圖37展示scAAV9.p546.CLN3小鼠顯示背內側核(MD)中的基於性別的不同程度的活化小神經膠質細胞(CD68⁺)。平均值± SEM，結合Tukey事後檢定的普通雙因素ANOVA， $*p<0.05$ ， $**p<0.01$ ， $***p<0.001$ ， $****p<0.0001$ 。

【0073】 圖38展示scAAV9.p546.CLN3小鼠顯示中線下核(SM)中的基於性別的不同程度的活化小神經膠質細胞(CD68⁺)。平均值± SEM，結合Tukey事後檢定的普通雙因素ANOVA， $*p<0.05$ ， $**p<0.01$ ， $***p<0.001$ ， $****p<0.0001$ 。

【實施方式】

【0074】 本申請案主張2019年2月4日提交的美國臨時專利申請案第62/800,911號的優先權，其以全文引用的方式併入本文。

序列表以引用的方式併入

【0075】 本申請案含有電腦可讀形式的序列表(檔案名：53576_SeqListing.txt；26,705個位元組-於2020年1月31日建立的ASCII文本檔案)作為揭示案的單獨部分，所述序列表以全文引用的方式併入本文。

【0076】 本揭示案提供了用於治療CLN3型巴藤病的方法及產品。所述方法涉及使用rAAV作為基因遞送載體將CLN3聚核苷酸遞送至受試者。

【0077】 腺相關病毒(AAV)係複製缺陷型細小病毒，其單股DNA基因組長度約為4.7 kb，包含145個核苷酸的末端反向重複(ITR)並且可用於

指病毒本身或其衍生物。所述術語涵蓋所有亞型以及天然存在及重組的形式，除非另有說明。存在多種血清型AAV。AAV的血清型各自與特定進化枝相關，其成員具有血清學及功能相似性。因此，進化枝亦可以指AAV。例如，AAV9序列稱為「進化枝F」序列(Gao等人，《病毒學期刊(J. Virol.)》，78: 6381-6388(2004)。本揭示案設想在特定進化枝內使用任何序列，例如進化枝F。AAV血清型之基因組的核苷酸序列係已知的。例如，AAV-1的完整基因組在GenBank寄存號NC_002077中提供；AAV-2的完整基因組在GenBank寄存號NC_001401及Srivastava等人，《病毒學期刊》，45: 555-564(1983)中提供；AAV-3的完整基因組在GenBank寄存號NC_1829中提供；AAV-4的完整基因組在GenBank寄存號NC_001829中提供；AAV-5基因組在GenBank寄存號AF085716中提供；AAV-6的完整基因組在GenBank寄存號NC_001862中提供；至少部分AAV-7及AAV-8基因組分別在GenBank寄存號AX753246及AX753249中提供；AAV-9基因組在Gao等人，《病毒學期刊》，78: 6381-6388 (2004)中提供；AAV-10基因組在《分子療法(Mol. Ther.)》，13(1): 67-76(2006)中提供；AAV-11基因組在《病毒學(Virology)》，330(2): 375-383(2004)中提供；AAV-12基因組的部分在Genbank寄存號DQ813647中提供；AAV-13基因組的部分在Genbank寄存號EU285562中提供。參見美國專利9,434,928中提供了AAVrh.74基因組的序列，其以引用的方式併入本文。AAV-B1基因組的序列在Choudhury 等人，《分子療法》，24(7): 1247-1257(2016)中提供。引導病毒DNA複製(rep)、衣殼化/包裝及宿主細胞染色體整合的順式作用序列包含在ITR中。三個AAV啟動子(其相對圖譜位置命名為p5、p19及p40)驅動編碼rep及cap基因的兩個AAV內部開放閱讀框的表現。兩個rep啟動

子(p5及p19)與單個AAV內含子的差異剪接(在核苷酸2107及2227處)結合使得rep基因產生四種rep蛋白(rep 78、rep 68、rep 52及rep 40)。Rep蛋白具有多種酶特性，所述酶特性最終負責複製病毒基因組。cap基因由p40啟動子表現，並且其編碼三種衣殼蛋白VP1、VP2及VP3。替代性剪接及非共有轉譯起始位點負責產生三種相關的衣殼蛋白。單一共有聚腺苷酸化位點位於AAV基因組的圖譜位置95處。AAV的生命週期及遺傳學在Muzyczka, 《當前微生物學及免疫學的話題 (Current Topics in Microbiology and Immunology)》,158: 97-129(1992)中評論。

【0078】 AAV獨特的特徵在於，其作為例如在基因治療中將外源DNA遞送至細胞的載體具有吸引力。培養中細胞的AAV感染係非細胞病變的，並且人類及其他動物的自然感染係沉默的及無症狀的。而且，AAV感染許多哺乳動物細胞，允許活體內靶向許多不同組織的可能性。而且，AAV緩慢轉導分裂及非分裂細胞，並且可以作為轉錄活性核游離基因體(染色體外元件)在彼等細胞的壽命期間基本上持久存在。原生AAV前病毒基因組作為質體中的所選殖DNA具有感染性，此使得重組基因組的構建成為可能。此外，由於引導AAV複製、基因組衣殼化及整合的信號包含在AAV基因組的ITR中，因此部分或全部內部約4.3 kb的基因組(編碼複製及結構衣殼蛋白，rep-cap)可以用如含有啟動子、感興趣的DNA及聚腺苷酸化信號的基因匣等外源DNA置換。在一些情況下，rep及cap蛋白以反式提供。AAV的另一個顯著特徵係其為極其穩定且強健的病毒。它容易耐受用於滅活腺病毒的條件(56°C至65°C，持續數小時)，使AAV的冷保存不太重要。甚至可以將AAV凍乾。最後，AAV感染的細胞不耐受重複感染。

【0079】 如本文所使用的術語「AAV」係指野生型AAV病毒或病毒

顆粒。術語「AAV」、「AAV病毒」及「AAV病毒顆粒」在本文中可互換使用。術語「rAAV」係指重組AAV病毒或重組感染性包封的病毒顆粒。術語「rAAV」、「rAAV病毒」及「rAAV病毒顆粒」在本文中可互換使用。

【0080】 術語「rAAV基因組」係指衍生自己修飾之天然AAV基因組的聚核苷酸序列。在一些實施例中，已經修飾rAAV基因組以移除天然cap及rep基因。在一些實施例中，rAAV基因組包括內源性5'及3'末端反向重複(ITR)。在一些實施例中，rAAV基因組包括來自AAV血清型的ITR，所述AAV血清型不同於衍生AAV基因組的AAV血清型。在一些實施例中，rAAV基因組包括感興趣的轉殖基因(例如，編碼CLN3的聚核苷酸)，其藉由末端反向重複(ITR)側接在5'及3'末端。在一些實施例中，rAAV基因組包括「基因匣」。示例性基因匣在圖1A中及SEQ ID NO: 4的核酸序列中示出。rAAV基因組可為自身互補(sc)基因組，其在本文中稱為「scAAV基因組」。可替代地，rAAV基因組可為單股(ss)基因組，其在本文中稱為「ssAAV基因組」。

【0081】 術語「scAAV」係指包括自身互補基因組的rAAV病毒或rAAV病毒顆粒。術語「ssAAV」係指包括單股基因組的rAAV病毒或rAAV病毒顆粒。

【0082】 本文提供的rAAV基因組可以包括編碼CLN3多肽的聚核苷酸。CLN3多肽包括SEQ ID NO: 1中所示的胺基酸序列，或具有與SEQ ID NO: 1中所闡述的胺基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列的多肽，並且其編碼具有CLN3活性的多肽(例如，與例如治療前的患者相比，治療時，溶酶體自

發螢光存儲材料的清除率增加、ATP合酶亞單位C的溶酶體聚集減少、以及患者中星形膠質細胞及小膠質細胞的活化減少中的至少一者)。

【0083】 在一些情況下，本文提供的rAAV基因組包括編碼CLN3多肽的聚核苷酸，其中所述聚核苷酸具有SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 2所闡述的核苷酸序列至少65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的聚核苷酸，並且編碼具有CLN3活性的多肽(例如，與例如治療前的患者相比，治療時，溶酶體自發螢光存儲材料的清除率增加、ATP合酶亞單位C的溶酶體聚集減少、以及患者中星形膠質細胞及小膠質細胞的活化減少中的至少一者)。

【0084】 在一些實施例中，本文提供的rAAV基因組包括編碼具有CLN3活性的多肽，並且在嚴格條件下與SEQ ID NO: 2的核酸序列或其互補序列雜交的聚核苷酸序列。術語「嚴格」用於指本領域通常理解為嚴格的條件。雜交的嚴格性主要由溫度、離子強度、以及如甲醯胺等變性劑的濃度確定。用於雜交及洗滌之嚴格條件的實例包含但不限於0.015 M氯化鈉、65°C至68°C下0.0015 M檸檬酸鈉，或0.015 M氯化鈉、0.0015 M檸檬酸鈉及42°C下50%甲醯胺。參見例如Sambrook等人，《分子選殖：實驗室手冊(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)》，第2版，冷泉港實驗室，(紐約冷泉港，1989)。

【0085】 在一些實施例中，本文提供的rAAV基因組包括側接編碼CLN3多肽之聚核苷酸的一個或多個AAV ITR。CLN3聚核苷酸可操作地連接至轉錄控制元件(包含但不限於啟動子、增強子及/或聚腺苷酸化信號

序列)，所述轉錄控制元件在靶細胞中起作用而形成基因匣。啟動子的實例係雞 β 肌動蛋白啟動子及P546啟動子。本文設想了其他啟動子，包含但不限於猿猴病毒40(SV40)早期啟動子、小鼠乳腺腫瘤病毒(MMTV)、人類免疫缺乏病毒(HIV)長末端重複序列(LTR)啟動子、MoMuLV啟動子、禽白血病毒啟動子、愛潑斯坦-巴爾病毒(Epstein-Barr virus)立即早期啟動子、勞氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)啟動子、以及人類基因啟動子，如但不限於肌動蛋白啟動子、肌球蛋白啟動子、延伸因子-1a啟動子、血紅蛋白啟動子及肌酸激酶啟動子。本文另外提供的係SEQ ID NO: 3中示出的P546啟動子序列，及與SEQ ID NO: 3中所闡述的核苷酸序列至少65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的啟動子序列，其係具有P546轉錄促進活性的啟動子。轉錄控制元件的其他實例係組織特異性控制元件，例如，允許在神經元內特異性表現或在星形膠質細胞內特異性表現的啟動子。實例包含神經元特異性烯醇酶及膠質原纖維酸性蛋白啟動子。亦設想了誘導型啟動子。誘導型啟動子的非限制性實例包含但不限於金屬硫蛋白啟動子、糖皮質激素啟動子、孕酮啟動子及四環素調節的啟動子。基因匣亦可以包含內含子序列，以便在哺乳動物細胞中表現時促進CLN3 RNA轉錄物的加工。此內含子的一個實例係SV40內含子。「包裝」係指一系列細胞內事件，其引起AAV顆粒的組裝及衣殼化。術語「生產」係指藉由包裝細胞生產rAAV(感染性的、包封的rAAV顆粒)的過程。

【0086】 AAV「rep」及「cap」基因分別係指編碼腺相關病毒的複製及衣殼化蛋白的聚核苷酸序列。AAV rep及cap在本文中稱為AAV「包

裝基因」。

【0087】 AAV的「輔助病毒」係指允許AAV(例如野生型AAV)被哺乳動物細胞複製及包裝的病毒。用於AAV之多種此類輔助病毒係本領域已知的，包含腺病毒、疱疹病毒及如牛痘病毒等痘病毒。腺病毒可以涵蓋許多不同的亞組，儘管最常用的係亞組C的5型腺病毒。許多人類、非人類哺乳動物及禽類的腺病毒係已知的並且可自如ATCC等寄存處獲得。疱疹病毒家族的病毒包含例如單純疱疹病毒(HSV)及愛潑斯坦-巴爾病毒(EBV)，以及巨細胞病毒(CMV)及偽狂犬病病毒(PRV)；此等亦可自如ATCC等寄存處獲得。

【0088】 「一種或多種輔助病毒功能」係指在輔助病毒基因組中編碼的一種或多種功能，其允許AAV複製及包裝(結合本文所述複製及包裝的其他要求)。如本文所描述，「輔助病毒功能」可以多種方式提供，包含藉由提供輔助病毒或向反式生產細胞提供例如編碼一種或多種必需功能的聚核苷酸序列。

【0089】 本文提供的rAAV基因組缺乏AAV rep及cap DNA。本文設想之rAAV基因組(例如ITR)中的AAV DNA可以來自適於衍生重組病毒的任何AAV血清型，包含但不限於AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13、AAV rh.74及AAV-B1。如上文所述，各種AAV血清型之基因組的核苷酸序列係本領域已知的。亦設想了具有衣殼突變的rAAV。參見例如Marsic等人,《分子療法(Molecular Therapy)》,22(11):1900-1909(2014)。本文亦設想經修飾的衣殼，並且包含具有各種轉譯後修飾的衣殼，如糖基化及脫醯胺。天冬醯胺或麩醯胺酸側鏈的脫醯胺作用

導致天冬醯胺殘基轉化為天冬胺酸或異天冬胺酸殘基，並且本文提供的rAAV衣殼中設想了麩醯胺酸向麩胺酸或異麩胺酸的轉化。參見例如Giles等人，《分子療法》，26(12): 2848-2862(2018)。本文亦設想經修飾的衣殼包括將rAAV引向受影響的組織及需要治療之器官的靶向序列。

【0090】 本文提供的DNA質體包括本文所描述的rAAV基因組。可以將DNA質體轉移至允許用AAV之輔助病毒(例如腺病毒、E1缺失的腺病毒或疱疹病毒)感染的細胞中，以將rAAV基因組裝配至具有AAV9衣殼蛋白的感染性病毒顆粒中。產生rAAV的技術係本領域的標準，其中將待包裝的rAAV基因組、rep及cap基因以及輔助病毒功能提供給細胞。rAAV顆粒的產生需要以下組分存在於單個細胞內(在本文中表示為包裝細胞)：rAAV基因組、與rAAV基因組分開(亦即不在其中)的AAV rep及cap基因，以及輔助病毒功能。AAV rep及cap基因可以來自任何可以衍生重組病毒的AAV血清型，並且可以來自與rAAV基因組ITR不同的AAV血清型。假型rAAV的產生在例如WO 01/83692中揭示，其以全文引用的方式併入本文。在各種實施例中，可以修飾AAV衣殼蛋白以增強重組rAAV的遞送。對衣殼蛋白的修飾通常係本領域已知的。參見例如US 2005/0053922及US 2009/0202490，其揭示內容以全文引用的方式併入本文。

【0091】 產生包裝細胞的方法係建立穩定表現rAAV產生之所有必需組分的細胞系。例如，包括缺乏AAV rep及cap基因之rAAV基因組的質體(或多個質體)、與rAAV基因組分開之AAV rep及cap基因、以及如新黴素抗性基因等可選擇的標記可以整合至細胞的基因組中。可以藉由如GC拖尾等程序將rAAV基因組引入細菌質體中(Samulski等人，1982，《美國國家科學院院刊(Proc. Natl. Acad. S6. USA)》，79:2077-2081)，添加含

有限制性核酸內切酶裂解位點的合成連接子(Laughlin等人，1983，《基因(Gene)》，23:65-73)或藉由直接鈍端連接(Senapathy及Carter，1984，《生物化學期刊(J. Biol. Chem.)》，259:4661-4666)。接著可以用如腺病毒等輔助病毒感染包裝細胞系。此方法的優點係細胞為可選擇的並且適合於大規模生產rAAV。合適方法的其他非限制性實例採用腺病毒或桿狀病毒而非質體將rAAV基因組及/或rep及cap基因引入包裝細胞。

【0092】 rAAV顆粒產生的一般原理評述於例如Carter，1992，《生物技術當前述評(Current Opinions in Biotechnology)》，1533-539；及Muzyczka，1992，《微生物學及免疫學的當前課題(Curr. Topics in Microbial. and Immunol.)》，158:97-129)中。各種方法描述於Ratschin等人，《分子與細胞生物學(Mol. Cell. Biol.)》4:2072(1984)；Hermonat等人，《美國國家科學院院刊》，81:6466(1984)；Tratschin等人，《分子與細胞生物學》5:3251(1985)；McLaughlin等人，《病毒學期刊》，62:1963(1988)；以及Lebkowski等人，1988《分子與細胞生物學》，7:349(1988)。Samulski等人，(1989，《病毒學期刊》，63:3822-3828)；美國專利號5,173,414；WO 95/13365及對應美國專利號5,658,776；WO 95/13392；WO 96/17947；PCT/US98/18600；WO 97/09441(PCT/US96/14423)；WO 97/08298(PCT/US96/13872)；WO 97/21825(PCT/US96/20777)；WO 97/06243(PCT/FR96/01064)；WO 99/11764；Perrin等人(1995)《疫苗(Vaccine)》13:1244-1250；Paul等人(1993)《人類基因療法(Human Gene Therapy)》4:609-615；Clark等人(1996)《基因療法(Gene Therapy)》3:1124-1132；美國專利號5,786,211；美國專利號5,871,982；以及美國專利號號6,258,595。前述文

獻在此以全文引用的方式併入本文，特別強調與rAAV顆粒產生有關的文獻的彼等部分。

【0093】 本文進一步提供產生感染性rAAV顆粒的包裝細胞。在一個實施例中，包裝細胞可為穩定轉型的癌細胞，如HeLa細胞、293細胞及PerC.6細胞(同源293系)。在另一個實施例中，包裝細胞可為未轉型之癌細胞的細胞，如低繼代293細胞(用腺病毒E1轉型的人類胚腎細胞)、MRC-5細胞(人類胚胎成纖維細胞)、WI-38細胞(人類胚胎成纖維細胞)、Vero細胞(猴腎細胞)及FRhL-2細胞(恆河猴胚肺細胞)。

【0094】 本文亦提供了包括本揭示案之rAAV基因組的rAAV(例如感染性衣殼化的rAAV顆粒)。rAAV的基因組缺乏AAV rep及cap DNA，亦即，在rAAV的基因組的ITR之間不存在AAV rep或cap DNA。rAAV基因組可為自身互補(sc)基因組。具有sc基因組的rAAV在本文中稱為scAAV。rAAV基因組可為單股(ss)基因組。具有單股基因組的rAAV在本文中稱為ssAAV。

【0095】 本文提供的示例性rAAV係名為「scAAV9.P546.CLN3」的scAAV。scAAV9.P546.CLN3 scAAV含有scAAV基因組，其包括在P546啟動子(SEQ ID NO: 3)控制下的人類CLN3 cDNA。scAAV基因組亦包括SV40內含子(人類CLN3 cDNA的上游)及牛生長激素聚腺苷酸化(BGH Poly A)終止子序列(人類CLN3 cDNA的下游)。此scAAV9.P546.CLN3基因匣的序列如SEQ ID NO: 4所示。scAAV基因組包裝在AAV9衣殼中，並且包含AAV2 ITR(P546啟動子上游的一個ITR及BGH Poly A終止子序列下游的另一個ITR)。

【0096】 rAAV可以藉由本領域標準方法純化，如藉由管柱層析法

或氯化銫梯度。自輔助病毒中純化rAAV的方法係本領域已知的，並且可以包含在例如Clark 等人，《人類基因療法》，10(6): 1031-1039(1999)；Schenpp 及 Clark，《分子醫學方法(*Methods Mol. Med.*)》，69: 427-443(2002)；美國專利號6,566,118及WO 98/09657。

【0097】亦提供了包括rAAV的組合物。組合物包括編碼CLN3多肽的rAAV。組合物可以包含編碼不同感興趣之多肽的兩種或更多種rAAV。在一些實施例中，rAAV係scAAV或ssAAV。

【0098】本文提供的組合物包括rAAV及藥學上可接受之一種或多種賦形劑。可接受之賦形劑對受體無毒，並且較佳為在所採用的劑量及濃度下係惰性的，並且包含但不限於緩衝液，如磷酸鹽[例如磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)]、檸檬酸鹽或其他有機酸；抗氧化劑，如抗壞血酸；低分子量多肽；蛋白質，如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸，如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、精胺酸或賴胺酸；單糖、二糖及其他碳水化合物，包含葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，如EDTA；糖醇，如甘露醇或山梨醇；成鹽抗衡離子，如鈉；及/或非離子界面活性劑，如吐溫、共聚物如泊洛沙姆(poloxamer)188，普郎尼克(pluronic)(如Pluronic F68)或聚乙二醇(PEG)。本文提供的組合物可以包括藥學上可接受之含水賦形劑，其含有非離子低滲透化合物，如碘比醇、碘海醇、碘美普爾、碘帕醇、碘噴托、碘普胺、碘佛醇、碘昔蘭，其中含有非離子低滲透化合物的水性賦形劑可以具有下列特性中的一者或多者：約180 mgI/mL，蒸氣壓滲透法測定的滲透壓約為322 mOsm/kg水，滲透壓約為273 mOsm/L，在20°C下絕對黏度為約2.3 cp並且在37°C下為約1.5 cp，並且在37°C下的比重為約1.164。示例性組合物包括約20%至40%的

非離子低滲透化合物或約25%至約35%的非離子低滲透化合物。一種示例性組合物包括調配於20 mM Tris(pH為8.0)、1 mM MgCl_2 、200 mM NaCl、0.001%泊洛沙姆188及約25%至約35%非離子低滲透化合物中的scAAV或rAAV病毒顆粒。另一種示例性組合物包括在1X PBS及0.001%普郎尼克F68中調配的scAAV。

【0099】 在本揭示案的方法中待投與的rAAV的劑量將根據例如特定rAAV、投藥方式、投藥時間、治療目標、個體及靶向的一種或多種細胞類型而變化，並且可以藉由本領域標準的方法確定。劑量可以病毒基因組(vg)單位表示。本文設想的劑量包括約 1×10^{11} 、約 1×10^{12} 、約 1×10^{13} 、約 1.1×10^{13} 、約 1.2×10^{13} 、約 1.3×10^{13} 、約 1.5×10^{13} 、約 2×10^{13} 、約 2.5×10^{13} 、約 3×10^{13} 、約 3.4×10^{13} 、約 3.5×10^{13} 、約 4×10^{13} 、約 4.5×10^{13} 、約 5×10^{13} 、約 6×10^{13} 、約 1×10^{14} 、約 1.2×10^{14} 、約 2×10^{14} 、約 3×10^{14} 、約 4×10^{14} 、約 5×10^{14} 、約 1×10^{15} 至約 1×10^{16} 或更多個總病毒基因組。約 1×10^{11} 至約 1×10^{15} vg、約 1×10^{12} 至約 1×10^{15} vg、約 1×10^{12} 至約 1×10^{14} vg、約 1×10^{13} 至約 6×10^{14} vg及約 6×10^{13} 至約 1.2×10^{14} vg的劑量亦是可以設想的。本文舉例說明的一種劑量係 6×10^{13} vg。本文舉例說明的另一劑量係 1.2×10^{14} 。

【0100】 提供了用rAAV轉導靶細胞(包含但不限於神經系統、神經或神經膠質細胞的細胞)的方法。神經系統的細胞包含神經元、下運動神經元、小神經膠質細胞、少突膠質細胞、星形膠質細胞、許旺氏細胞或其組合。

【0101】 術語「轉導」用於指藉由本揭示案的複製缺陷型rAAV在活體內或在試管內向靶細胞投與/遞送CLN3聚核苷酸，導致受體細胞表現

功能性多肽。用本揭示案的rAAV轉導細胞引起由rAAV編碼之多肽或RNA的持續表現。因此，本揭示案提供了藉由鞘內，腦室內，腦實質內或靜脈內途徑或其任何組合向受試者投與/遞送編碼CLN3多肽之rAAV的方法。鞘內遞送係指遞送至腦或脊髓之蛛網膜下的空間。在一些實施例中，鞘內投與係藉由腦池內投與。

【0102】 鞘內投與在本文中舉例說明。此等方法包含用本文所描述的一種或多種rAAV轉導靶細胞(包含但不限於神經及/或神經膠質細胞)。在一些實施例中，將包括編碼CLN3多肽之聚核苷酸的rAAV病毒顆粒投與或遞送至患者的腦及/或脊髓。在一些實施例中，將聚核苷酸遞送至腦。設想用於遞送的腦區域包含但不限於運動皮質、視覺皮質、小腦及腦幹。在一些實施例中，將聚核苷酸遞送至脊髓。在一些實施例中，將聚核苷酸遞送至神經元或下運動神經元。多核苷酸聚核苷酸可以遞送至神經及神經膠質細胞。神經膠質細胞係小膠質細胞、少突膠質細胞或星形膠質細胞。在一些實施例中，將聚核苷酸遞送至許旺氏細胞。

【0103】 在本文提供的方法的一些實施例中，在投與rAAV後(例如約5分鐘、約10分鐘、約15分鐘或約20分鐘)將患者保持在特倫德倫伯格位置(頭向下位置)。例如，患者可以在頭部向下位置傾斜約1度至約30度、約15度至約30度、約30度至約60度、約60度至約90度或約90度至約180度。

【0104】 本文提供的方法包括將包括本文提供的rAAV的組合物的有效劑量或有效多劑量投與有需要之受試者(例如，包含但不限於人類患者的動物)的步驟。若在CLN3型巴金森病發展之前投與劑量，則投與係預防性的。若在CLN3型巴金森病發展之後投與劑量，則投與係治療性的。有效

劑量係減輕(消除或減少)與疾病相關之至少一種症狀的劑量，其減緩或阻止疾病的進展、減少疾病的程度、導致疾病的緩解(部分或全部)及/或延長生存期。與治療前的受試者相比或與未治療的受試者相比，本文提供的方法引起用於評估CLN3巴藤病進展及/或改善之量表(例如統一的巴藤病評估系統(UBDRS)或漢堡運動及語言量表)中的一項或多項穩定、進展減少或改善。UBDRS評估量表(如Marshall等人，《神經病學(Neurology)》，2005 65(2):275-279中所描述)[包含UBDRS物理評估量表、UBDRS癲癇發作評估量表、UBDRS行為評估量表、UBDRS能力評估量表、UBDRS症狀發作序列及UBDRS臨床總體印象(CGI)]；小兒生活品質量表(PEDSQOL)量表、運動功能、語言功能、認知功能及生存。與治療前的受試者相比或與未治療的受試者相比，本文提供的方法可以引起以下中的一者或多者：自發螢光存儲材料的溶酶體聚集減少或減緩、ATP合成酶亞單位C的溶酶體聚集減少或減緩、減少或減緩膠質細胞活化(星形膠質細胞及/或小膠質細胞)活化；減少或減緩星形細胞增生，並且顯示藉由MRI測量的腦量損失減少或延遲。

【0105】亦提供了組合療法。如本文所使用的組合包含同時治療或順序治療。本文所描述的方法與標準醫學治療的組合係特別設想的。另外，根據本發明用於同時治療或連續治療的組合物的組合(例如scAAV9.P546.CLN3與本文揭示的造影劑的組合)係特別設想的。

【0106】雖然設想了在出生後向有需要之受試者遞送，但亦設想了胎兒宮內分娩。

實例

【0107】雖然以下實例描述了具體實施例，但應理解，本領域中熟

習此項技術者將想到變化及修改。因此，僅申請專利範圍中出現的此等限制才能適用於本發明。

【0108】 在實例中，產生攜帶在P546啟動子控制下的CLN3 cDNA的自身互補型AAV(命名為scAAV9.P546.CLN3)。P546啟動子係MeCP2啟動子的截斷形式，允許轉殖基因神經元及星形膠質細胞中發生中等量的表現。在CLN3^{Δex7/8}敲入小鼠模型中測試此基因治療載體的療效，所述模型攜帶在人類患者中發現的最頻繁突變。評估scAAV9.P546.CLN3在CLN3^{Δex7/8}敲入小鼠模型、野生型小鼠及非人類靈長類動物活體內的安全性及療效。來自小鼠及非人類靈長類動物的資料清楚地證明整個腦及脊髓中星形膠質細胞及神經元的有效轉導，包含深部腦結構，如丘腦、海馬、紋狀體、杏仁核、髓質及小腦。

實例1

產生scAAV9.P546.CLN3

【0109】 藉由美國Eurofin Genomics合成包含介於兩個Not1限制性位點之間之人類CLN3(SEQ ID NO: 2)之開放閱讀框的DNA，並且接著插入基於雙股AAV2-ITR的生產質體中。質體構建體的示意圖顯示AAV2 ITR之間所插入的CLN3 DNA [5'ITR如先前在McCarty等人，《基因療法》8:1248-1254(2001)中所述進行修飾以產生scAAV]，如圖1所示。質體構建體亦包含P546啟動子、SV40嵌合內含子及牛生長激素(BGH)聚腺苷酸化信號。

【0110】 scAAV9.P546.CLN3在cGMP條件下藉由使用基於雙股AAV2-ITR之生產質體的瞬時三重質體轉染程序產生，其中質體編碼如前所述的Rep2Cap9序列[Gao等人，《病毒學期刊》，78: 6381至

6388(2004)]，以及在 HEK293 細胞中的腺病毒輔助質體 pHelper(Stratagene, Santa Clara, CA)。藉由兩個氯化銫密度梯度純化步驟純化病毒，相對於PBS透析並且用0.001% 普郎尼克-F68調配以防止病毒聚集並且在4℃下存儲。使用Taq-Man技術藉由定量PCR滴定所有scAAV製劑。藉由4%至12%十二烷基硫酸鈉-丙烯醯胺凝膠電泳及銀染(Invitrogen, Carlsbad, CA)評估scAAV的純度。

實例2

CSF 遞送的scAAV9.P546.CLN3在CLN3^{Δex7/8}小鼠中的長期療效研究

細胞靶向及表現

【0111】為了證實病毒引入的人類CLN3在小鼠中的表現及生物分佈，將scAAV9.P546.CLN3調配於1×PBS及0.001% 普郎尼克F68中或調配於20 mM Tris(pH8.0)、1 mM MgCl₂、200 mM NaCl、0.001%泊洛沙姆188中，且在出生36小時內經由腦室內(ICV)注射投與CLN3^{Δex7/8}小鼠，並且在不同時間點監測表現。注射等體積PBS的野生型及CLN3^{Δex7/8}小鼠作為對照。使用NCH病毒載體核心效價，有效投與劑量為 2.2×10^{10} vg/小鼠。

【0112】為了獲得詳細的腦生物分佈特徵曲線，RNAscope原位雜交技術被用於特異性識別腦、頸椎脊髓、胸椎脊髓及腰椎脊髓中的人類CLN3 mRNA。此技術涉及使用RNA與特異性探針的原位雜交來單獨偵測由scAAV9編碼的人類轉殖基因。與PBS注射之對照中的無信號相比，在注射後4個月及6個月觀察到強信號，尤其在注射scAAV9.P546.CLN3之CLN3^{Δex7/8}小鼠的皮質(區A至C)中。所述分析證明，AAV9遞送的CLN3轉

殖基因在腦的各個區域(包含皮質、丘腦、後腦、小腦及脊髓)中以足夠的量表現。在小腦中，浦肯野神經元(Purkinje neuron)中的信號特別強烈。在4個月及6個月時藉由逆轉錄PCR在腦及脊髓的所有區域中亦偵測到轉殖基因表現(圖2)。

【0113】 總之，對來自CLN3^{Δex7/8}小鼠之組織進行的逆轉錄PCR資料及 RNAscope 分析證實，注射後長達6個月，單次ICV注射scAAV9.P546.CLN3引起人類CLN3在整個腦及脊髓中的成功靶向及表現。此證實了ICV介導scAAV9特異性遞送至靶細胞的有效性，所述靶細胞不成比例地參與CLN3型巴藤病的發病機制。CLN3^{Δex7/8}小鼠模型中的表現資料在野生型小鼠的研究中進一步證實，使用相同的引物藉由定量RT-PCR偵測人類轉殖基因。

遞送scAAV9.P546.CLN3後的病理學改善

自發螢光存儲材料(ASM)的聚集

【0114】 自發螢光存儲材料(ASM)的聚集係巴藤病進展的標誌性組織學標記(Mole等人，《生物化學與生物物理學報-疾病分子基礎(Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.)》2015；1852(10):2237-2241；Cotman等人，《臨床血脂學期刊(Clin Lipidol.)》2012年2月；7(1):79-91；Seehafer等人，《衰老神經生物學(Neurobiol Aging.)》2006；27:576-588)。ASM的聚集係許多形式之巴藤病之疾病進展的強有力指標(Bosch等人，《神經科學期刊(J Neurosci.)》2016；36(37):9669-9682；Morgan等人，《公共科學圖書館綜合(PLoS One.)》2013；8(11):e78694)。本文設想ASM的減少用作成功治療的指標。作為CLN3型巴藤病最早可偵測的疾病表現之一，ASM在2月齡CLN3^{Δex7/8}小鼠的許多腦區域中已經可見(圖

3)。

【0115】螢光像素區的自動定量證實，在2月齡的經scAAV9.P546.CLN3注射之CLN3^{Δex7/8}小鼠中，體覺皮質及丘腦中的聚集ASM顯著降低。由於在此個早期時間點，在PBS治療的CLN3^{Δex7/8}小鼠中觀察到運動皮質及視覺皮質中ASM聚集的較高變異性，此兩個區域之分析統計功效較低。在注射後4個月及6個月，與PBS治療的CLN3^{Δex7/8}小鼠相比，所有四個腦區域示出了ASM聚集的極顯著降低(圖4)。當將scAAV9.P546.CLN3注射的CLN3^{Δex7/8}小鼠與野生型動物進行比較時，注射後4個月scAAV9.P546.CLN3注射之CLN3^{Δex7/8}小鼠的體覺及視覺皮質中發現略高的ASM含量，而在運動皮質及丘腦中野生型與scAAV9.P546.CLN3治療的CLN3^{Δex7/8}小鼠之間沒有發現顯著差異。在注射後6個月，所有區域在野生型及scAAV9.P546.CLN3治療的CLN3^{Δex7/8}小鼠中顯示相當低的ASM含有，與PBS治療的CLN3^{Δex7/8}小鼠相比低得多，證實了ASM聚集的持久性及高效減少($p \leq 0.0001$)。(每組N = 10)，除了4個月的視覺皮質($p \leq 0.001$)及注射後6個月的運動皮質($p \leq 0.001$)，PBS與scAAV9.P546.CLN3治療的動物之間 $p \leq 0.0001$ 。

粒線體蛋白ATP合成酶亞單位C的聚集

【0116】分析野生型及注射CLN3^{Δex7/8} PBS或注射scAAV9.P546.CLN3之小鼠的腦組織中ATP合成酶亞單位C的聚集。在健康個體中，此蛋白質係粒線體膜中呼吸鏈的一部分，但是在患有巴藤病的患者中，蛋白質異常地在溶酶體中聚集(Palmer等人，《美國醫學遺傳學期刊(Am J Med Genet.)》1992；42(4):561-567)。在CLN3^{Δex7/8}小鼠中，與野生型動物相比，截至4月齡時，丘腦腹側後內側核及腹側後外側核

(VPM/VPL區域)(NCL小鼠模型中早期時常受到影響的腦區域)中的亞單位C聚集明顯(Morgan等人,《公共科學圖書館綜合》2013; 8(11):e78694; Pontikis等人,《疾病神經生物學(Neurobiol Dis.)》2005; 20(3):823-836)。雖然未經治療的動物在體覺皮質及丘腦的VPM/VPL區域中顯示聚集之ATP合酶sub C的強信號,但scAAV9.P546.CLN3治療的動物在注射後4個月及6個月顯示與野生型動物相當的最小信號(圖5)(PBS與scAAV9.P546.CLN3治療的動物之間的 $p \leq 0.0001$)。

膠質細胞及星形膠質細胞活化

【0117】除了存儲材料的異常聚集及ATP合成酶sub C的聚集之外,人類患者及動物模型中疾病進展的其他組織學標誌物包含星形膠質細胞及小膠質細胞的活化(Cotman等人,《人類分子遺傳學》2002; 11(22):2709-2721; Morgan等人,《公共科學圖書館綜合(PLoS One.)》2013; 8(11):e78694; Pontikis等人,《疾病神經生物學(Neurobiol Dis.)》2005; 20(3):823-836; Palmer等人,《美國醫學遺傳學期刊》1992; 42(4):561-567)。詳言之,反應性小膠質細胞被預致敏而釋放如IL1- β 26等促炎介質,此可能是CLN3型巴藤病晚期神經元細胞死亡的關鍵原因。藉由在4個月及6個月時間點針對膠質原纖維酸性蛋白(GFAP)染色來鑑定VPM/VPL丘腦及體覺皮質切片中的活化星形膠質細胞。對於體覺皮質而言,在所述體覺皮質之皮質層IV內的桶狀皮質中進行定量。在圖6中示出了注射後6個月的代表性影像。

【0118】治療4個月及6個月後,對GFAP陽性面積的定量表明,與注射PBS的CLN3 ^{Δ ex7/8}小鼠相比,注射scAAV9.P546.CLN3之CLN3 ^{Δ ex7/8}小鼠之兩個腦區域中的星形膠質細胞活化顯著降低(圖6)。雖然,與PBS

治療的CLN3^{Δex7/8}小鼠相比，注射scAAV9.P546.CLN3的CLN3^{Δex7/8}小鼠在此等腦區域中的GFAP染色水準要低得多，但在分析的大多數區域，其在注射後4個月及6個月時都保持在野生型水準以上。

【0119】亦使用抗CD68染色作為活化小膠質細胞的標記，測定VPM/VPL及體覺皮質切片中的膠質細胞活化。CD68係溶酶體蛋白，其在針對如吞噬作用等促炎功能預致敏的細胞中上調(Seehafer等人，《神經免疫學期刊(J Neuroimmunol.)》2011；230:169-172)。與星形膠質細胞觀察到的相似，與4個月後注射PBS之CLN3^{Δex7/8}小鼠相比，注射AAV9的CLN3^{Δex7/8}小鼠在VPM/VPL及體覺皮質區中的膠質細胞活化顯著降低(圖7)。在體覺皮質中，用scAAV9.P546.CLN3治療使CD68染色降低至與野生型小鼠相當的水準。在6個月時間點，在VPM/VPL區域中，與經PBS治療的CLN3^{Δex7/8}小鼠相比，scAAV9.P546.CLN3治療的CD68染色水準沒有顯著改善，然而，在scAAV9.P546.CLN3治療的小鼠的體覺皮質中反應性神經膠質仍然存在顯著減少(圖7)。

在遞送scAAV9.P546.CLN3後的行為改善

【0120】在人類CLN3型巴藤病患者中，與如CLN3型巴藤病(晚期嬰兒巴藤病)等早期發病的疾病變體相比，運動及認知功能障礙等神經功能缺損明顯較晚，此可能是由於截斷的CLN3蛋白的殘留功能所致(Kitzmüller等人，《人類分子遺傳學》2008年1月15日；17(2):303-12)。表型的此延遲亦存在於CLN3^{Δex7/8}小鼠模型中。在scAAV9.P546.CLN3的療效研究中，從2月齡開始，並且以2個月的間隔持續，對小鼠進行一系列行為測試範例，包含：加速旋轉棒測定及爬桿以測試運動功能及協調，以及莫里斯水迷宮來評估學習及記憶。目前，動物在注射後已經被跟蹤10個

月，並且正在進行研究。以前表徵此小鼠模型的出版物指示神經發育行為的初始延遲，隨後是正常化，並且以後從大約10月齡至12月齡開始下降(Osório等人，《基因大腦及行為》2009年4月；8(3): 337-345)。

【0121】 旋轉棒分析示出了野生型與PBS或治療後的CLN3^{Δex7/8}小鼠之間在注射後18個月沒有統計學顯著差異。

【0122】 每2個月進行一次旋轉棒測定。將小鼠置放在加速輪上，並且測量時間直至其跌落。在每個時間點，在早晨訓練小鼠並且在下午4小時後進行測試。與先前揭示的資料不同，觀察到注射後直至18個月的野生型小鼠及PBS CLN3^{Δex7/8}小鼠的表現沒有顯著差異(Bosch等人，《神經科學期刊》2016；36(37): 9669-9682)。然而，在雌性WT小鼠對PBS治療的CLN3^{Δex7/8}小鼠，在注射後2個月觀察到跌落潛伏期的顯著差異。與先前資料相比，此差異最可能在於測試方案的設計及/或住房中的環境因素。本研究使用的當前方案僅在每個時間點的一天測試動物，而先前公佈的資料在4天的時間跨度內重複測試。而且，本研究使用的方案以稍低的起始速度(36 rpm對40 rpm)進行，並且與先前公佈的資料(4小時休息對2小時休息)相比，在早晨訓練與下午測試期間之間具有更長的時間間隔。而且，訓練設置亦有所不同：在之前的研究中，小鼠只在早上以恆定的5 rpm進行車輪滑轉訓練5分鐘，在當前研究中的動物使用與在下午測試中應用的相同設置進行訓練，此導致車輪每2秒加速0.3 rpm。總之，在注射後長達18個月，與具有所描述的設置的野生型動物(圖8，上圖)相比，在未治療或scAAV9.P546.CLN3治療的CLN3^{Δex7/8}小鼠中未觀察到保持加速旋轉棒輪的能力缺陷。

【0123】 莫里斯水迷宮分析示出了在注射後2個月、4個月、16個月

及18個月野生型與 $CLN3^{\Delta ex7/8}$ 小鼠之間的統計學顯著差異。

【0124】 在莫里斯水迷宮測試中，將動物置放在含有隱藏平台之充滿水的池中。訓練之後，動物利用環境定位線索找到隱藏平台所花費的時間作為學習及記憶能力的標誌加以測量。在注射後2個月及4個月，在野生型動物與PBS或scAAV9.P546.CLN3治療的 $CLN3^{\Delta ex7/8}$ 小鼠之間觀察到統計學差異，表明在所述疾病的此時間點，藉由此測試可以測量的學習及記憶受到損害，從而導致動物發現隱藏平台的潛伏期。此外，在16個月及18個月時，在野生型與PBS或scAAV9.P546.CLN3治療的 $CLN3^{\Delta ex7/8}$ 小鼠之間觀察到潛伏期的更顯著統計學差異(圖9，左上圖)。16個月時增加的潛伏期亦與PBS治療之 $CLN3^{\Delta ex7/8}$ 小鼠的游泳速度增加相關(圖9，右上圖)。另外，當按性別分開時，在第16個月及第18個月，在雄性野生型動物與scAAV9.P546.CLN3治療的 $CLN3^{\Delta ex7/8}$ 小鼠之間觀察到潛伏期的統計學差異(圖9，左中圖)，而scAAV9.P546.CLN3治療的 $CLN3^{\Delta ex7/8}$ 雄性小鼠游泳速度在16個月時顯著下降(圖9，中右圖)。與野生型或PBS治療的 $CLN3^{\Delta ex7/8}$ 動物相比，scAAV9.P546.CLN3治療的雌性 $CLN3^{\Delta ex7/8}$ 小鼠在18個月時顯示顯著增加的潛伏期(圖9，左下圖)，而PBS治療的 $CLN3^{\Delta ex7/8}$ 雄性小鼠游泳速度在16個月時顯著增加(圖9，右下圖)。

【0125】 與 PBS 注射的動物相比，爬桿分析顯示scAAV9.P546.CLN3治療之 $CLN3^{\Delta ex7/8}$ 的表現改善。

【0126】 爬桿測試測量當將小鼠面朝向上置放在垂直桿上時轉身所花費的時間，以及當將其面朝下置放在垂直桿上時下桿的時間。而且，有時亦會測量在試圖轉身或下降時自桿上跌落的次數。此測試評估協調及平衡能力。

【0127】 在注射後10個月及12個月，與PBS治療的動物相比，scAAV9.P546.CLN3動物在下桿中顯著更快(圖10，左上圖)。在注射後10個月及12個月，PBS治療的CLN3^{Δex7/8}動物下桿時所花費的時間中看到的統計學顯著差異，而野生型及scAAV9.P546.CLN3治療的CLN3^{Δex7/8}是難以區分的(圖10，左上圖)。關於動物自面朝上的位置轉向面向下所花費的時間，發現了兩個統計學顯著差異。在2月齡及16月齡時，與scAAV9.P546.CLN3及PBS治療的CLN3^{Δex7/8}小鼠相比，野生型動物轉身顯著更快。與雌性小鼠(圖10，左下圖)相比，此差異在雄性小鼠中更明顯(圖10，左中圖)，其中與野生型相比沒有看到差異。2個月及16個月的時間點係研究組之間觀察到此參數差異的唯一時間點(圖10，左上圖)。

【0128】 自桿跌落의 平均次數中看到另外的統計學顯著差異，其中PBS治療的CLN3^{Δex7/8}雄性及雌性與野生型及scAAV9.P546.CLN3治療的動物相比更頻繁地跌落(圖11)。上圖：scAAV9.P546.CLN3治療的動物與PBS治療的動物之間在第2個月跌落次數中發現了顯著差異。在注射後16個月，野生型與PBS治療的CLN3^{Δex7/8}小鼠之間亦觀察到統計學顯著差異。中圖：僅雄性。PBS治療的CLN3^{Δex7/8}小鼠比其他治療組更頻繁地自桿上跌落，在注射後16個月具有最大的統計學顯著性。下圖：雌性注射後8個月跌落的差異顯著，但在整個研究期間趨勢是明顯的。每個治療組(5M/5F)N = 5。有趣的是，在整個18個月期間看到自桿跌落的差異，並且在早期時間點(4個月)以及8個月及16個月時具有統計學意義。在8個月時，差異僅在雌性中具有統計學顯著性，但在雄性中亦存在明顯的趨勢，並且在注射後16個月的雄性中具有統計學顯著性。通常，PBS治療的CLN3^{Δex7/8}雄性比其他治療組更頻繁地自桿跌落。

【0129】總之，有強有力的證據表明用scAAV9.P546.CLN3治療CLN3^{Δex7/8}小鼠可防止ASM物質以及ATP合酶亞單位C的聚集，此兩者均為CLN3型巴藤病進展的主要標誌。此等資料與膠質細胞活化(星形膠質細胞及小膠質細胞)的強烈減少相關。儘管在疾病早期階段，行為表型改善的第一趨勢變得明顯：scAAV9.P546.CLN3治療的CLN3^{Δex7/8}小鼠與PBS治療的動物相比更能夠下垂直桿，因為其移動得更快並且不經常跌落。總之，此等資料支持scAAV9.P546.CLN3基因療法作為此疾病的治療策略。

實例3

用scAAV9.P546.GFP在小鼠中進行表現研究

【0130】P546啟動子允許以與雞-β-肌動蛋白(CBA)啟動子類似的方式在整個CNS中表現轉殖基因。為了在兩個啟動子之間進行並列比較，在出生後第1天，以每隻動物 5×10^{10} 個病毒基因組給小鼠注射scAAV9.CB.GFP或scAAV9.P546.GFP，其調配於1×PBS及0.001%普郎尼克F68或20 mM Tris(pH 8.0)、1 mM MgCl₂、200 mM NaCl、0.001%泊洛沙姆188中。3週後，處死動物並且將腦直接置於螢光解剖顯微鏡下。自螢光影像顯而易見，GFP分佈相似，但接受scAAV9.P546.GFP之動物的螢光水準低於接受scAAV9.CB.GFP之動物的螢光水準，證實了P546啟動子與CBA啟動子相比，轉殖基因的表現量更為溫和。

【0131】另一隻小鼠注射scAAV9.P546.GFP並且保持存活200天。200天後，處死動物並且對全腦矢狀切片進行染色以獲得GFP表現。甚至注射後200天，在包括皮質、海馬、中腦、髓質、杏仁核及小腦的整個大腦中亦觀察到GFP轉殖基因的廣泛表現，進一步表明P546啟動子係CNS基因療法的良好候選者。

【0132】 來自各種組織及腦區域的蛋白質墨點資料進一步支持來自GFP螢光及GFP免疫螢光染色的資料。在用scAAV9.P546.GFP(n = 3)治療的小鼠中使用液體系統進行螢光蛋白質墨點技術注射後三週，可以容易地偵測到GFP表現，而用作對照的PBS注射動物中未偵測到色帶(n = 1)。轉殖基因表現在全腦溶解物以及包含皮質、髓質、中腦、海馬區、小腦及脊髓的區域特異性溶解物中是明顯的。

【0133】 然而，在心臟及肝臟中亦證實了GFP表現，而肺及脾顯示很少甚至沒有轉錄物表現(圖12)。使用scAAV9.P546.GFP的蛋白質墨點資料與來自小鼠及非人類靈長類動物安全性研究的表現資料一致，其中發現了非常相似的表現譜。而且，腦及外周器官中的此表現模式與scAAV9.CB.GFP中發現的模式相當。

【0134】 總之，使用免疫染色及蛋白質墨點技術在小鼠中進行廣泛的表現分析指示P546啟動子在整個神經系統中導致非常相似及持久的表現譜，同時與強CBA啟動子相比允許表現量更溫和。

實例4

用scAAV9.P546.CLN3在非人類靈長類動物中進行表現研究

【0135】 單劑量的 3.4×10^{13} vg scAAV9.P546.CLN3存在於1×PBS及0.001%普郎尼克F68中，並且投與三隻3歲至4歲的食蟹猴中。

【0136】 在注射scAAV9.P546.CLN3之食蟹猴的腦組織中進行靶向分析時，使用對人類CLN3轉殖基因具有特異性並且不與內源性非人類靈長類動物CLN3 RNA交叉反應的引物在RNA水準上分析靶向。來自注射後12週處死的食蟹猴之一之各個腦區域之組織中的逆轉錄定量PCR顯示人類CLN3在脊髓、皮質、丘腦、紋狀體、小腦及視網膜中的所有水準之表

現，進一步強調了scAAV9的廣泛覆蓋以及用P546啟動子在整個腦及脊髓中表現轉錄物(圖13)。值得注意的是，偵測載體衍生之人類CLN3所用的引物不與內源性NHP CLN3轉錄物交叉反應。因此，針對在腰椎脊髓中發現的載體衍生之CLN3 RNA水準進行歸一化，所述水準設定為1，而非注射鹽水或未注射的動物，因為歸一化為零是不可能的。肌動蛋白用作歸一化基因。

【0137】 總之，來自非人類靈長類動物的資料證明scAAV9在單次鞘內腰椎注射後穿過神經系統並且到達CNS大部分區域的潛力高。值得注意的是，藉由鞘內注射scAAV9.P546.CLN3治療的所有非人類靈長類動物均很好地耐受治療，並且在注射後6個月的任何時間點均未觀察到任何動物的副作用。

實例5

scAAV9.P546.CLN3基因療法的臨床試驗

【0138】 scAAV9.P546.CLN3將藉由鞘內遞送給患有CLN3型巴藤病的人類患者。

【0139】 用於臨床試驗的scAAV由全國兒童醫院臨床製造設施(Nationwide Children's Hospital Clinical Manufacturing Facility)利用HEK293細胞的三重轉染方法在如實例1中所描述的cGMP條件下產生。

【0140】 選擇參與的患者3歲至10歲，診斷有CLN3疾病，如根據基因型確定。第一組($n = 3$)將接受每位患者一次性基因轉移劑量為 6×10^{13} vg總scAAV。scAAV9.P546.CLN3在 20 mM 1 mM $MgCl_2$ 、200 mM NaCl、0.001%泊洛沙姆188 Tris(pH為8.0)中調配，並且將藉由腰椎穿刺插入的鞘內導管一次性遞送至棘突間進入腰椎間隙囊的蛛網膜下腔內。安

全性將根據臨床情況進行評估，並且藉由檢查安全標記進行評估。每個受試者的登記之間將至少有四週的時間，以允許審查基因轉移後第30天的安全性資料。若不存在安全問題，則在注射後一個月評估第三個受試者後，將登記另外四個受試者的第二組。組2(n = 4)中的每個受試者將接受遞增劑量的 1.2×10^{14} vg總scAAV。在組1完成與組2開始之間將至少有六週的時間窗口，以允許從五個時間點(第1天、第2天、第7天、第14天及第21天)以及DSMB審查安全性分析在給予下一個受試者之前進行審查。

【0141】 疾病進展將使用UBDRS量表(在上文的詳細描述中參考)並且使用小兒生活品質(PEDSQOL)量表的治療對生活品質的影響以及延長存活的潛力來測量。

【0142】 當所有患者完成為期三年的研究時，將評估療效的主要分析。確定療效的基礎將是基於專門針對CLN3型巴藤病開發的完善的統一巴藤病評定量表(UBDRS)來穩定或減少疾病的進展。完成三年研究期後，根據FDA規則每年監測患者，持續5年。

實例6

Cln3^{Δ7/8}小鼠模型中的其他研究

【0143】 如實例中所述，經由在出生後第1天腦室內(ICV)注射對2隻野生型(WT)及*Cln3*Δ7/8小鼠給藥PBS、scAAV9.p546.CLN3或scAAV9.CB.CLN3基因療法。在此項研究中，對小鼠投與 5×10^{10} vg/動物(4 μL體積)。

【0144】 選擇注射方法及時間以針對CLN3型巴藤病患者中有相關性的特異性神經元群體。在該程序期間經由降低體溫鎮靜動物，進行監測直至完全恢復，且如前所述進行基因分型(參見Morgan等人 *PLoS One* 8;

and Laboratory, TJ Protocol 18257: Standard PCR Assay)。

【0145】 使用GraphPad Prism進行統計分析，且在圖例中記錄細節。大體而言，雙因素ANOVA與適當的事後檢定一起使用，且用ROUT方法移除離群值， $Q=0.1-1\%$ 。適當時，使用非配對t檢定。

hCLN3轉錄物在大腦中的表現及分佈

【0146】 進行定量PCR以量測經治療小鼠的大腦中的hCLN3轉錄物。如先前所描述產生總RNA及cDNA(參見Cain等人 Mol Ther., 2019)。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法計算參照作為看家對照的*Gapdh*歸一化的人類CLN3轉錄物的相對基因表現。*hCLN3*正向引子序列：CGCTAGCATCTCATCAGGCCTTG(SEQ ID NO: 11)；*hCLN3*反向引子序列：AGCATGGACAGCAGGGTCTG(SEQ ID NO: 12)。

【0147】 如圖16中所示，如qPCR所量測的，scAAV9.p546.CLN3治療導致*Cln3*^{47/8}小鼠的大腦皮質及脊髓中hCLN3轉錄物表現量的增加，直至24個月大。因此，單次新生ICV投與scAAV9.p546.CLN3導致hCLN3的持續且良好靶向的表現。

【0148】 此外，進行RNAscope以偵測經治療小鼠的大腦中的CLN3轉錄物。用CO₂使小鼠安樂死且對心臟灌注PBS。收集大腦且置放於1 mm矢狀腦區上。在中線及中線靠右3 mm處對大腦切片。用-50℃異戊烷將3 mm矢狀片急速冷凍，接著於低溫恆溫器中以16 μ m切割且置放於載玻片上。接著根據製造商建議的方案(ACDBio手冊320293及320513)處理載玻片。用人特異性CLN3探針(ACDBio目錄號470241)標記切片，所述探針由在小鼠與人CLN3(區域631-1711)之間具有很小同源性的CLN3基因區域中的20個雙Z成對物組成。利用RNAscope Fluorescent Multiplex套組

(ACDBio目錄號320850)，使用標記具有550 nm螢光團的*hCLN3*探針的Amp 4-FL-AltC對載玻片進行螢光標記，用DAPI對載玻片進行對比染色以標記核。使用防淬滅安裝介質(Dako faramount, Agilent)將組織切片安裝在蓋玻片下的載玻片上。載玻片在成像之前儲存在暗處。使用Nikon NiE顯微鏡與NIS-Elements Advanced Research軟體(v4.20)對切片成像及分析。

【0149】如圖 17 所示，如 RNAscope(紅色螢光)所量測的，scAAV9.p546.CLN3治療在*Cln3*^{Δ7/8}小鼠的整個大腦中產生穩定的*hCLN3*轉錄物，直至24個月大。定量PCT及RNAscope分析證實單次新生ICV投與 scAAV9.p546 導致 *hCLN3* 的持續且良好靶向的表現。scAAV9.p546.CLN3基因療法增加整個大腦及脊髓中的*hCLN3*基因表現，直至24個月大。

典型巴藤病病理

【0150】為了確定投與scAAV9.p546.CLN3是否預防*Cln3*^{Δ7/8}小鼠的大腦中的典型巴藤病病理，在ICV投與後檢查儲存材料累積(ASM)及神經膠質反應性。用CO₂使野生型及*Cln3*^{Δ7/8}小鼠安樂死，灌注PBS，且用4% PFA固定組織。在振盪切片機上以50 μm(Leica VT10008)對固定的大腦進行切片。利用標準免疫螢光及DAB染色方案處理切片。初級抗體包括抗CD68(AbD Serotec, MCA1957; 1:2000)、抗GFAP(Dako, Z0334; 1:8000)及抗ATP合成酶子單位C(Abcam, ab181243, 1:1000)。二級抗體包括生物素化的抗大鼠及抗兔(Vector Labs, BA-9400; 1:2000)。使用Aperio Slide掃描顯微鏡在20X下對切片進行成像及分析。自丘腦的VPM/VPL及體覺皮質的層2/3選取圖像，其中自每隻動物獲取多個組織的多個圖像。

在ImageJ中使用臨限值分析來定量免疫反應性的總面積。

【0151】 圖18展示scAAV9.p546.CLN3治療預防且減少*Cln3*^{Δ7/8}小鼠的大腦的兩個區域中的ASM累積，直至24個月大。圖19展示scAAV9.p546.CLN3治療通常預防在*Cln3*^{Δ7/8}小鼠的大腦的兩個區域中累積大量的子單位C(ASM的組分)，直至24個月大。圖20展示scAAV9.p546.CLN3治療通常預防在*Cln3*^{Δ7/8}大腦的兩個區域中的星形細胞活化(GFAP+)，直至24個月大。圖21展示，視時間點而定，scAAV9.p546.CLN3治療預防在*Cln3*^{Δ7/8}大腦的兩個區域中的一些小神經膠質活化(CD68+)，直至24個月大。因此，scAAV9.p546.CLN3預防*Cln3*^{Δ7/8}小鼠的大腦中的典型巴藤病病理，包括儲存材料累積及神經膠質反應性。圖22展示scAAV9.CB.CLN3治療在預防6及12月大的*Cln3*^{Δ7/8}小鼠的各種巴藤病病理方面係同樣有效的。

【0152】 此外，如截至ICV投與後24個月所量測的，scAAV9.p546.CLN3治療並未引起任何紅血球(CBC)異常或白血球(WBC)異常。圖23提供以下CBC參數的資料：RBC計數、血紅素、血容比、平均紅血球體積、平均紅血球血紅素、平均紅血球血紅素濃度、RBC分佈、血小板計數及平均血小板體積。圖24提供以下WBC參數的資料：WBC計數、淋巴球計數百分比、單核球百分比、顆粒球百分比。

【0153】 scAAV9.p546.CLN3基因療法預防*Cln3*^{Δ7/8}小鼠的CLN3巴藤病的許多細胞標誌，直至24個月大，包括ASM、子單位C、GFAP及CD68表現。此外，scAAV9.CB.CLN3基因療法預防*Cln3*^{Δ7/8}小鼠的CLN3巴藤病的許多細胞標誌，直至24個月大，包括ASM、子單位C、GFAP及CD68表現。

實例7

Cln3^{Δ7/8}小鼠模型中的基於性別的病理組織學分析

【0154】 如實例2中所述，經由在出生後第1天腦室內(ICV)注射對野生型(WT)及 *Cln3*Δ7/8 小鼠給藥 PBS、scAAV9.p546.CLN3 或 scAAV9.CB.CLN3 基因療法。在此項研究中，對小鼠投與 5×10^{10} vg/動物 (4 μL 體積)。

【0155】 用CO₂使野生型及 *Cln3*^{Δ7/8} 小鼠安樂死，灌注 PBS，且用 4% PFA 固定組織。在振盪切片機上以 50 μm (Leica VT10008) 對固定的大腦進行切片。利用標準免疫螢光及 DAB 染色方案處理切片。初級抗體包括抗 CD68 (AbD Serotec, MCA1957; 1:2000) 及抗 ATP 合成酶子單位 C (Abcam, ab181243, 1:1000)。二級抗體包括生物素化的抗大鼠及抗兔 (Vector Labs, BA-9400; 1:2000)。使用 Aperio Slide 掃描顯微鏡在 20X 下對切片進行成像及分析。自以下區域選取圖像：海馬體的 CA2/CA3 區、海馬體齒狀回的多形層、基側扁桃體、韁、丘腦的網狀核、丘腦的腹後外側/腹後內側核、丘腦的背內側及中線下區域、梨狀皮層、壓後皮質及體覺皮質的層 2/3，其中自每隻動物獲取多個組織的多個圖像。在 ImageJ 中使用臨限值分析來定量免疫反應性的總面積。

【0156】 圖25展示用 scAAV9.p546.CLN3 治療的小鼠在 12 月大時顯示海馬體的 CA3 區域中的基於性別的不同程度的 SubC 累積。在 12 個月大時，經治療的雌性 *Cln3*^{Δ7/8} 小鼠比野生型累積顯著更多的 SubC，而經治療的雄性中的 SubC 累積與野生型沒有不同。然而，此種差別在分析的任何其他時間點沒有被觀察到。

【0157】 圖26展示用 scAAV9.p546.CLN3 治療的小鼠在多個時間點

顯示在梨狀皮層(PIRC)中的基於性別的略微不同程度的SubC累積。在12個月大時，經治療的雌性突變型CLN3小鼠比野生型累積顯著更多的SubC，其中AAV治療沒有將累積預防在PBS突變型水準以下，而經治療的雄性中的SubC累積與野生型沒有不同。然而，此種關聯在分析的任何其他時間點沒有被觀察到，且與18個月大時的發現係一致的，其中經治療雌性中的SubC累積與野生型沒有顯著不同且顯著低於未治療的突變型小鼠。在18個月大時，經治療的雄性中的SubC累積變得顯著高於WT水準。

【0158】 圖27展示用scAAV9.p546.CLN3治療的小鼠在多個時間點顯示網狀丘腦核(RTN)中的基於性別的不同程度的SubC累積。在6個月大時，經治療的雌性突變型CLN3小鼠比野生型累積顯著更多的SubC，而經治療的雄性中的SubC累積與野生型沒有不同。在12個月大時，經治療的雄性保持在野生型水準，而經治療的雌性具有比野生型及未治療的突變型小鼠顯著更多的SubC。在18個月時，不存在經治療和未經治療的雌性突變體之間的此種差別，其中SubC顯著高於WT，但顯著低於雄性及雌性中的未治療突變體。

【0159】 圖28展示用scAAV9.p546.CLN3治療的小鼠在12個月時顯示體覺皮質中的基於性別的不同程度的SubC累積。在12個月大時，與未治療的突變型雌性相比，AAV治療並未減少SubC累積，而經治療雄性中的SubC累積被防止且與野生型沒有不同。然而，此種差別在分析的任何其他時間點沒有被觀察到。

【0160】 圖29展示用scAAV9.p546.CLN3治療的小鼠在12個月時展示丘腦的VPM/VPL中的基於性別的不同程度的SubC累積。在6個月大時，經治療的雌性累積的SubC顯著少於未治療的突變型雌性，但顯著多

於野生型雌性。此種差別在12及18個月時持續，在分析的任何時間點在野生型與經治療雄性之間沒有差別。

【0161】 圖30展示用scAAV9.p546.CLN3治療的小鼠在12個月時顯示基側扁桃體(BLA)中的基於性別的不同程度的SubC累積。在12個月大時，AAV並未顯著預防經治療的雌性動物中的SubC累積。在18個月時，經治療雌性中的SubC累積保持顯著高於野生型，但低於未治療的雌性。在18個月時，經治療雄性也開始具有顯著高於其野生型對應物的SubC，這與雌性群組中所觀察到的情況類似。

【0162】 圖31展示用scAAV9.p546.CLN3治療的小鼠在12及18個月時顯示齒狀回(DG)的多形層中的基於性別的不同程度的SubC累積。在12個月大時，經治療雌性似乎累積了比野生型雌性及未治療的突變型雌性顯著更多的SubC。原始圖像(未顯示)揭示了齒狀回的多形層周圍的變暗的顆粒細胞層，其可能影響定限結果。此種變暗只在此群組中且只在12月時間點時存在。此種增加在雌性中在18個月時也不再被觀察到，然而，在18個月時，經治療雄性開始具有比野生型雄性更多的SubC累積。

【0163】 圖32展示用scAAV9.p546.CLN3治療的小鼠在12及18個月時顯示韁中的基於性別的不同程度的SubC累積。在12個月大時，經治療雌性累積的SubC顯著少於未治療的突變型雌性，但顯著多於野生型雌性。此種差別在18個月時也被觀察到，在分析的任何時間點在野生型與經治療雄性之間沒有差別。

【0164】 圖33展示用scAAV9.p546.CLN3治療的小鼠在12及18個月時顯示背內側核中的基於性別的不同程度的SubC累積。在12個月大時，經治療雌性累積的SubC顯著少於未治療的突變型雌性，但顯著多於野生

型雌性。此種差別在18個月時也被觀察到，在分析的任何時間點在野生型與經治療雄性之間沒有差別。

【0165】 圖34展示用scAAV9.p546.CLN3治療的小鼠顯示壓後皮質(RSC)中的基於性別的SubC累積程度沒有不同。在分析的任何時間點在野生型與經治療雄性之間沒有差別。

【0166】 圖35展示用scAAV9.p546.CLN3治療的小鼠在6個月時顯示體覺皮質(S1BF)中的基於性別的不同程度的活化小神經膠質細胞(CD68⁺)。在6個月大時，與野生型及未治療的雌性相比，經治療雌性具有增加的小神經膠質細胞活化，而經治療的雄性高於野生型雄性但低於未治療的雄性。在12及18個月大時未觀察到性別差別。

【0167】 圖36展示用scAAV9.p546.CLN3治療的小鼠顯示丘腦的VPM-VPL中的基於性別的不同程度的小神經膠質細胞活化。在6個月大時，與野生型及未治療的雌性相比，經治療雌性具有增加的小神經膠質細胞活化，而經治療的雄性高於野生型雄性但低於未治療的雄性。此種差別在12個月時也被觀察到。在18個月時在雌性群組中也觀察到同樣的情況，然而，經治療雄性在此時間點與野生型沒有顯著不同。

【0168】 圖37展示scAAV9.p546.CLN3小鼠顯示背內側核(MD)中的基於性別的不同程度的活化小神經膠質細胞(CD68⁺)。在6個月大時，與野生型及未治療的雌性相比，經治療雌性具有增加的小神經膠質細胞活化，而經治療的雄性高於野生型雄性但低於未治療的雄性。在12及18個月大時，經治療雄性具有高於野生型的小神經膠質細胞活化及低於未治療的雄性的活化，而治療似乎對雌性沒有效果。

【0169】 圖38展示用scAAV9.p546.CLN3治療的小鼠顯示中線下核

(SM)中的基於性別的不同程度的活化小神經膠質細胞。在6個月大時，與野生型及未治療的雌性相比，經治療雌性具有增加的小神經膠質細胞活化，而經治療的雄性與未治療的雄性沒有顯著不同，兩者均具有比野生型更多的活化。截至12個月，治療似乎對每種性別中的小神經膠質細胞活化程度沒有影響。截至18個月，經治療雄性具有低於野生型程度的小神經膠質細胞活化，而經治療雌性保持與未治療的雌性相同程度的活化。

【0170】 前述資料展示用scAAV9.p546.CLN3治療的動物具有基於性別的差異性病理，其與 $Cln3^{47/8}$ 小鼠大腦的若干區域中的ATP合成酶子單位C累積及CD68⁺小神經膠質活化相關。基於性別的差異性病理差別似乎在雌性中更有特異性。12個月時間點係大部分差別被始終觀察到的時間，其中許多差別只在12個月時出現且在18個月時不再存在。

【0171】 雖然已經在本文示出並且描述了本發明的較佳實施例，但是對本領域中熟習此項技術者而言顯而易見的是此實施例僅以實例方式提供。在不背離本發明的情況下，本領域中熟習此項技術者現在將想到許多變化、改變及替代。應理解，可以採用本文所述實施例的各種替代方案。希望以下申請專利範圍限定本發明的範圍以及由此覆蓋在此等申請專利範圍及其等效物範圍內的方法及結構。

【0172】 本申請案中提及的所有文獻均以全文引用的方式併入本文。

【序列表】

<110> 美國全美兒童醫院之研究學會(Research Institute at Nationwide Children's Hospital)
美國俄亥俄州創新基金會(Ohio State Innovation Foundation)

<120> 腺相關病毒對CLN3聚核苷酸的遞送

<150> US 62/800,911
<151> 2019-02-04

<160> 12

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1
<211> 438
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 未歸類的特徵
<223> CLN3

<400> 1

Met Gly Gly Cys Ala Gly Ser Arg Arg Arg Phe Ser Asp Ser Glu Gly
1 5 10 15

Glu Glu Thr Val Pro Glu Pro Arg Leu Pro Leu Leu Asp His Gln Gly
20 25 30

Ala His Trp Lys Asn Ala Val Gly Phe Trp Leu Leu Gly Leu Cys Asn
35 40 45

Asn Phe Ser Tyr Val Val Met Leu Ser Ala Ala His Asp Ile Leu Ser
50 55 60

His Lys Arg Thr Ser Gly Asn Gln Ser His Val Asp Pro Gly Pro Thr
65 70 75 80

Pro Ile Pro His Asn Ser Ser Ser Arg Phe Asp Cys Asn Ser Val Ser
85 90 95

Thr Ala Ala Val Leu Leu Ala Asp Ile Leu Pro Thr Leu Val Ile Lys
100 105 110

Leu Leu Ala Pro Leu Gly Leu His Leu Leu Pro Tyr Ser Pro Arg Val
115 120 125

Leu Val Ser Gly Ile Cys Ala Ala Gly Ser Phe Val Leu Val Ala Phe
130 135 140

Ser His Ser Val Gly Thr Ser Leu Cys Gly Val Val Phe Ala Ser Ile
145 150 155 160

Ser Ser Gly Leu Gly Glu Val Thr Phe Leu Ser Leu Thr Ala Phe Tyr
165 170 175

Pro Arg Ala Val Ile Ser Trp Trp Ser Ser Gly Thr Gly Gly Ala Gly
180 185 190

Leu Leu Gly Ala Leu Ser Tyr Leu Gly Leu Thr Gln Ala Gly Leu Ser
195 200 205

Pro Gln Gln Thr Leu Leu Ser Met Leu Gly Ile Pro Ala Leu Leu Leu
210 215 220

Ala Ser Tyr Phe Leu Leu Leu Thr Ser Pro Glu Ala Gln Asp Pro Gly
225 230 235 240

Gly Glu Glu Glu Ala Glu Ser Ala Ala Arg Gln Pro Leu Ile Arg Thr
245 250 255

Glu Ala Pro Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ser Ser Ser Leu Ser Leu Arg
260 265 270

Glu Arg Trp Thr Val Phe Lys Gly Leu Leu Trp Tyr Ile Val Pro Leu
275 280 285

Val Val Val Tyr Phe Ala Glu Tyr Phe Ile Asn Gln Gly Leu Phe Glu
290 295 300

Leu Leu Phe Phe Trp Asn Thr Ser Leu Ser His Ala Gln Gln Tyr Arg
305 310 315 320

Trp Tyr Gln Met Leu Tyr Gln Ala Gly Val Phe Ala Ser Arg Ser Ser
325 330 335

Leu Arg Cys Cys Arg Ile Arg Phe Thr Trp Ala Leu Ala Leu Leu Gln
340 345 350

Cys Leu Asn Leu Val Phe Leu Leu Ala Asp Val Trp Phe Gly Phe Leu
355 360 365

Pro Ser Ile Tyr Leu Val Phe Leu Ile Ile Leu Tyr Glu Gly Leu Leu
370 375 380

Gly Gly Ala Ala Tyr Val Asn Thr Phe His Asn Ile Ala Leu Glu Thr
385 390 395 400

Ser Asp Glu His Arg Glu Phe Ala Met Ala Ala Thr Cys Ile Ser Asp
405 410 415

Thr Leu Gly Ile Ser Leu Ser Gly Leu Leu Ala Leu Pro Leu His Asp
420 425 430

Phe Leu Cys Gln Leu Ser
435

<210> 2
<211> 1317
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> 未歸類的特徵
<223> CNL3

<400>	2	
atgggaggct	gtgcaggctc	gcggcggcgc ttttcggatt ccgaggggga ggagaccgtc 60
ccggagcccc	ggctccctct	gttggaccat cagggcgcgc attggaagaa cgcggtgggc 120
ttctggctgc	tgggcctttg	caacaacttc tcttatgtgg tgatgctgag tgccgcccac 180
gacatcctta	gccacaagag	gacatcggga aaccagagcc atgtggaccc aggcccaacg 240
ccgatacccc	acaacagctc	atcacgattt gactgcaact ctgtctctac ggctgctgtg 300
ctcctggcgg	acatcctccc	cacactcgtc atcaaattgt tggtcctct tggccttcac 360
ctgctgccct	acagcccccg	ggttctcgtc agtgggattt gtgctgctgg aagcttcgtc 420
ctggttgcct	tttctcattc	tgtggggacc agcctgtgtg gtgtggtctt cgctagcatc 480
tcatcaggcc	ttggggaggt	caccttcctc tccctcactg ctttctaccc cagggccgtg 540
atctcctggt	ggtcctcagg	gactggggga gctgggctgc tgggggccct gtcctacctg 600
ggcctcacco	aggccggcct	ctccccacag cagaccctgc tgtecatgct gggatccct 660
gccctgctgc	tggccagcta	tttcttgttg ctcacatctc ctgaggccca ggaccctgga 720
ggggaagaag	aagcagagag	cgcagcccgg cagccccca taagaaccga ggccccggag 780
togaagccag	gtccagctc	cagcctctcc ctccgggaaa ggtggacagt gttcaagggt 840
ctgctgtggt	acattgttcc	cttggtcgta gtttactttg ccgagtattt cattaaccag 900
ggactttttg	aactcctctt	tttctggaac acttccctga gtcacgctca gcaataccgc 960
tggtaccaga	tgctgtacca	ggctggcgtc tttgcctccc gctcttctct ccgctgctgt 1020
cgcataccgt	tacctgggc	cctggccctg ctgcagtgcc tcaacctggt gttcctgctg 1080
gcagacgtgt	ggttcggctt	tctgccaagc atctacctcg tcttccctgat cattctgtat 1140
gaggggctcc	tgggaggcgc	agcctacgtg aacaccttcc acaacatcgc cctggagacc 1200
agtgatgagc	accgggagtt	tgcaatggcg gccacctgca tctctgacac actggggatc 1260
tccctgtcgg	ggctcctggc	tttgcctctg catgacttcc tctgccagct ctccctga 1317

- <210> 3
- <211> 546
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<220>
<221> 未歸類的特徵
<223> P546啓動子

<400> 3	
gaacaacgcc aggtcctca acaggcaact ttgctacttc tacagaaaat gataataaag	60
aaatgctggt gaagtcaaat gcttatcaca atggtgaact actcagcagg gaggctctaa	120
taggcgccaa gaggctagac ttctttaagc gccagagtcc acaagggccc agttaatcct	180
caacattcaa atgctgcccc caaaaccagc cctctgtgc cctagccgcc tcttttttcc	240
aagtgacagt agaactccac caatccgcag ctgaatgggg tccgcctctt ttcctgcct	300
aaacagacag gaactcctgc caattgaggg cgtcaccgct aaggctccgc cccagcctgg	360
gtccacaaac caatgaaggg taatctcgac aaagagcaag gggtagggcg cgggcgcgca	420
ggcgcagcag cacacaggct ggtcgggagg gcggggcgcg acgtctgccg tgcgggggtcc	480
cggcatcggt tgcgcgcgcg ctccctcctc tcggagagag ggctgtggtg aaaccctcc	540
ggaaaa	546

<210> 4
<211> 2479
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<220>
<221> 未歸類的特徵
<223> CLN3基因匣

<400> 4	
ctgcgcgctc gtcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt	60
ggcgcgccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggaatt caattcacgc	120
gccggtaccg aattcacgcg tgaacaacgc caggctcctc aacaggcaac tttgctactt	180

ctacagaaaa	tgataataaa	gaaatgctgg	tgaagtcaaa	tgcttatcac	aatggtgaac	240
tactcagcag	ggaggctcta	ataggcgcca	agagcctaga	cttccttaag	cgccagagtc	300
cacaagggcc	cagttaatcc	tcaacattca	aatgctgccc	acaaaaccag	cccctctgtg	360
ccctagccgc	ctcttttttc	caagtgcag	tagaactcca	ccaatccgca	gctgaatggg	420
gtccgcctct	tttccctgcc	taaacagaca	ggaactcctg	ccaattgagg	gcgtcaccgc	480
taaggctccg	ccccagcctg	ggctccacaa	ccaatgaagg	gtaatctcga	caaagagcaa	540
ggggtggggc	gcgggcgcgc	aggtgcagca	gcacacaggc	tggtcgggag	ggcggggcgc	600
gacgtctgcc	gtgcggggtc	ccggcatcgg	ttgcgcgcgc	gtccctcct	ctcggagaga	660
gggctgtggt	aaaaccgcgc	cggaaaacgc	gtcgaagggc	gaattctgca	gataactggt	720
aagtttagtc	ttttttgtct	tttatttcag	gtcccggatc	cggtggtggt	gcaaatacaa	780
gaactgctcc	tcagtcgatg	ttgcctttac	ttctaggcct	gtacggaagt	gttactaccg	840
gtatgggagg	ctgtgcaggc	tcgcggcggc	gcttttcgga	ttccgagggg	gaggagaccg	900
tcccggagcc	ccggtccct	ctgttggaac	atcagggcgc	gcattggaag	aacgcggtgg	960
gcttctggct	gctgggcctt	tgcaacaact	tctcttatgt	ggtgatgctg	agtgccgccc	1020
acgacatcct	tagccacaag	aggacatcgg	gaaaccagag	ccatgtggac	ccaggcccaa	1080
cgccgatecc	ccacaacagc	tcatcacgat	ttgactgcaa	ctctgtctct	acggtgctg	1140
tgtcctggc	ggacatcctc	cccacactcg	tcatcaaatt	gttggctcct	cttggccttc	1200
acctgctgcc	ctacagcccc	cgggttctcg	tcagtgggat	ttgtgctgct	ggaagcttcg	1260
tcttggttgc	cttttctcat	tctgtgggga	ccagcctgtg	tggtgtggtc	ttcgctagca	1320
tctcatcagg	ccttggggag	gtcaccttcc	tctccctcac	tgccttctac	cccagggccg	1380
tgatctcctg	gtggtcctca	gggactgggg	gagctgggct	gctgggggcc	ctgtcctacc	1440
tgggcctcac	ccaggccggc	ctctcccctc	agcagaccct	gctgtccatg	ctgggtatcc	1500
ctgccctgct	gctggccagc	tatttcttgt	tgtcacatc	tctgaggcc	caggaccctg	1560
gaggggaaga	agaagcagag	agcgcagccc	ggcagcccct	cataagaacc	gaggccccgg	1620
agtcgaagcc	aggctccagc	tccagcctct	cccttcggga	aagggtggaca	gtgttcaagg	1680

gtctgctgtg gtacattgtt ccttggtcg tagtttactt tgccgagtat ttcattaacc	1740
agggactttt tgaactcctc tttttctgga acatttcct gagtcacgt cagcaatacc	1800
gctggtacca gatgctgtac caggctggcg tctttgcctc ccgtctttct ctccgtgct	1860
gtcgcacccg tttcacctgg gccctggccc tgctgcagtg cctcaacctg gtgttcctgc	1920
tggcagacgt gtggttcggc tttctgccaa gcattacct cgtcttcctg atcattctgt	1980
atgaggggct cctgggaggc gcagcctacg tgaacacctt ccacaacatc gccctggaga	2040
ccagtgatga gcaccgggag tttgcaatgg cggccacctg catctctgac aactgggga	2100
tctccctgtc ggggctcctg gctttgcctc tgcatgactt cctctgccag ctctcctgac	2160
ctgcaggcct cgactgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg	2220
ccttccttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt	2280
gcacgcatt gtctgagtag gtgtcattct attcgcatgc tggggagaga tcgactgag	2340
gaaccctag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg ctgcctcgt cactgaggcc	2400
gggcgaccaa aggtcgcccc acgcccgggc ttgccccggg cggcctcagt gagcgagcga	2460
gcgcgcagag agggagtgg	2479

<210> 5
<211> 6008
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<220>
<221> 未歸類的特徵
<223> pAAV.P546.CLN3.KAN質體

<400> 5 gccaatacgc caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcgta	60
atagcgaaga ggccccgacc gatcgccctt cccaacagtt ggcgagcctg aatggcgaat	120
ggcgattccg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat	180

agtttgagtt cttctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca	240
acggttaatt tgcgtgatgg acagactcct ttactcggtg gcctcactga ttataaaaac	300
acttctcagg attctggcgt accgttcctg tctaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt	360
agctcccgtc ctgattctaa cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata	420
gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcggggtgt gtggttacgc gcagcgtgac	480
cgtacacatt gccagcgcgc tagcgcgcgc tcctttcgtc ttcttccttt cctttctcgc	540
cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccccttag ggttccgatt	600
tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg	660
gccatcgcgc tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag	720
tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt	780
ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt	840
taacgcgaat tttaacaaaa tattaacgct tacaatttaa atatttgctt atacaatctt	900
cctgtttttg gggettttct gattatcaac cgggggtacat atgattgaca tgctagtttt	960
acgattaccg ttcategcgc tgcgcgctcg ctcgctcact gaggccgcgc gggcaaagcc	1020
cgggcgtcgg gcgacctttg gtcgcccggc ctcagtgage gagcgagcgc gcagagaggg	1080
agtggaattc aattcacgcg ccggtaccga attcacgcgt gaacaacgcc aggctcctca	1140
acaggcaact ttgctacttc tacagaaaat gataataaag aaatgctggg gaagtcaaat	1200
gcttatcaca atggtgaact actcagcagg gaggcctctaa taggcgccaa gagcctagac	1260
ttccttaagc gccagagtcc acaagggccc agttaatcct caacattcaa atgctgccca	1320
caaaaccagc ccctctgtgc cctagccgcc tcttttttcc aagtgacagt agaactccac	1380
caatccgcag ctgaatgggg tccgcctctt ttccctgcct aaacagacag gaactcctgc	1440
caattgaggg cgtcaccgct aaggctccgc ccagccctgg gctccacaac caatgaaggg	1500
taatctcgac aaagagcaag gggtagggcg cgggcgcgca ggtgcagcag cacacaggct	1560
ggtcgggagg gcggggcgcg acgtctgccg tgcgggggtc cggcatcggt tgcgcgcgcg	1620
ctccctcctc tcggagagag ggctgtggtg aaaccctcc gaaaacgcg tcgaagggcg	1680

aattctgcag ataactggta agtttagtct tttttgtctt ttatttcagg tcccggatcc	1740
ggtggtggtg caaatcaaag aactgctcct cagtcgatgt tgcctttact tctaggcctg	1800
tacggaagtg ttactaccgg tatgggaggc tgtgcaggct cgcggcggcg cttttcggat	1860
tccgaggggg aggagaccgt cccggagccc cggctccctc tgttggacca tcagggcgcg	1920
cattggaaga acgcggtggg cttctggctg ctgggccttt gcaacaactt ctcttatgtg	1980
gtgatgctga gtgccgccc cgacatcctt agccacaaga ggacatcggg aaaccagagc	2040
catgtggacc caggcccaac gccgatcccc cacaacagct catcacgatt tgactgcaac	2100
tctgtctcta cggctgctgt gctcctggcg gacatcctcc ccacactcgt catcaaattg	2160
ttggctcctc ttggccttca cctgctgccc tacagcccc gggttctcgt cagtgggatt	2220
tgtgctgctg gaagcttcgt cctggttgcc ttttctcatt ctgtggggac cagcctgtgt	2280
ggtgtggtct tcgctagcat ctcatcaggc cttggggagg tcaccttctt ctccctcact	2340
gccttctacc ccagggccgt gatctcctgg tggtcctcag ggactggggg agctgggctg	2400
ctggggggccc tgtcctacct gggcctcacc caggccggcc tctcccctca gcagaccctg	2460
ctgtccatgc tgggtatccc tgccctgctg ctggccagct atttcttggt gctcacatct	2520
cctgaggccc aggaccctgg aggggaagaa gaagcagaga gcgcagcccc gcagcccctc	2580
ataagaaccg aggccccgga gtcgaagcca ggctccagct ccagcctctc ccttcgggaa	2640
aggtggacag tgttcaaggg tctgctgtgg tacattgttc ccttggtcgt agtttacttt	2700
gccgagtatt tcattaacca gggacttttt gaactcctct ttttctggaa cacttccttg	2760
agtcacgctc agcaataccg ctggtaccag atgctgtacc aggctggcgt ctttgccctcc	2820
cgtctttctc tccgctgctg tcgcatccgt ttcacctggg ccctggccct gctgcagtgc	2880
ctcaacctgg tgttcttget ggcagacgtg tggttcggtt ttctgccaag catctacctc	2940
gtcttcctga tcattctgta tgaggggctc ctgggaggcg cagcctacgt gaacaccttc	3000
cacaacatcg ccctggagac cagtgatgag caccgggagt ttgcaatggc ggccacctgc	3060
atctctgaca cactggggat ctccctgtcg gggtccttgg ctttgccctct gcatgacttc	3120
ctctgccage tctcctgacc tgcaggcctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt	3180

tgtttgcccc	tcccccggtgc	cttccttgac	cctggaaggt	gccactccca	ctgtcctttc	3240
ctaataaaat	gaggaaattg	catcgcattg	tctgagtagg	tgtcattcta	ttcgcatgct	3300
ggggagagat	cgatctgagg	aacccttagt	gatggagtig	gccactccct	ctctgcgcgc	3360
tcgtcgcctc	actgaggccg	ggcgaccaaa	ggtcgccccg	cgcccgggct	ttgcccgggc	3420
ggcctcagtg	agcgagcgag	cgcgcagaga	gggagtggcc	ccccccccc	cccccccggc	3480
gattctcttg	tttgctccag	actctcaggc	aatgacctga	tagcctttgt	agagacctct	3540
caaaaatagc	taccctctcc	ggcatgaatt	tatcagctag	aacggttgaa	tatcatattg	3600
atggtgattt	gactgtctcc	ggcctttctc	acccgtttga	atctttacct	acacattact	3660
caggcattgc	atttaaaata	tatgagggtt	ctaaaaattt	ttatccttgc	gttgaaataa	3720
aggcttctcc	cgcaaaagta	ttacagggtc	ataatgtttt	tggtacaacc	gatttagctt	3780
tatgctctga	ggctttattg	cttaattttg	ctaattcttt	gccttgccctg	tatgatttat	3840
tggtatgttg	aatcgccctga	tgcggtattt	tctccttacg	catctgtgcg	gtatttcaca	3900
cgccatatgg	tgcactctca	gtacaatctg	ctctgatgcc	gcatagttaa	gccagccccg	3960
acaccgccca	acactatggg	gcactctcag	tacaatctgc	tctgatgccg	catagttaag	4020
ccagccccga	caccgcgcaa	caccgctga	cgcgccctga	cgggcttgtc	tgtccccggc	4080
atccgcttac	agacaagctg	tgaccgtctc	cgggagctgc	atgtgtcaga	ggttttcacc	4140
gtcatcaccg	aaacgcgcga	gacgaaaggg	cctcgtgata	cgcctatttt	tataggttaa	4200
tgtcatgaga	caataaccct	gataaatgct	tcaataatat	tgaaaaagga	agagtatgag	4260
ccatattcaa	cgggaaacgt	cgaggccgcg	attaaattcc	aacatggatg	ctgatttata	4320
tgggtataaa	tgggctcgcg	ataatgtcgg	gcaatcaggt	gcgacaatct	atcgcttgta	4380
tgggaagccc	gatgcgccag	agttgtttct	gaaacatggc	aaaggtagcg	ttgccaatga	4440
tgttacagat	gagatggtea	gactaaactg	gctgacggaa	tttatgccac	ttccgaccat	4500
caagcatttt	atccgtactc	ctgatgatgc	atggttactc	accactgcga	tccccggaaa	4560
aacagcgttc	caggtattag	aagaatatcc	tgattcaggt	gaaaatattg	ttgatgcgct	4620
ggcagtgttc	ctgcgccggt	tgcactcgat	tcctgtttgt	aattgtcctt	ttaacagcga	4680

tcgcgtatTT cgcctcgctc aggcgcaatc acgaatgaat aacggTTtgg ttgatgcgag	4740
tgatTTttgat gacgagcgta atggctggcc tgttgaacaa gtctggaaag aaatgcataa	4800
actTTttgccA ttctcaccgg attcagtcgt cactcatggt gatttctcac ttgataacct	4860
tatTTtttgac gaggggaaat taataggTTtG tattgatgTT ggacgagtcg gaatcgcaga	4920
ccgataaccag gatcttGCCA tectatggaa ctgcctcggt gagTTttctc cttcattaca	4980
gaaacggctt tttcaaaaat atggTattga taatcctgat atgaataaat tgcagTTtca	5040
TTtgatgctc gatgagTTTT tctaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat	5100
tgatTTtaaaa cttcatTTTT aatttaaaag gatctaggTg aagatccttt ttgataatct	5160
catgaccaaA atcccttaac gtgagTTttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa	5220
gatcaaagga tcttcttgag atcctTTTTt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa	5280
aaaaccaccg ctaccagcgg tggTTtgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctTTTTcc	5340
gaaggtaact ggcttcagca gagegcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta	5400
gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca taacctgctc tgctaatect	5460
gttaccagtg gctgctGCCA gtggcgataa gtctgtcttt accgggttgg actcaagacg	5520
atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag	5580
cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc	5640
cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggtA agcggcaggg tcggaacagg	5700
agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt	5760
tcgccacctc tgacttgagc gtcgatTTTT gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg	5820
gaaaaacgcc agcaacgcgg cTTTTttacg gttcctggcc ttttgctggc cTTTTgtca	5880
catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgttgataac cgtattaccg cttttgagtg	5940
agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc	6000
ggaagagc	6008

<210> 6
<211> 106
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成聚核苷酸

<220>

<221> 未歸類的特徵

<223> 5' ITR

<400> 6

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60

ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgg 106

<210> 7

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成聚核苷酸

<220>

<221> 未歸類的特徵

<223> SV40內含子

<400> 7

ggtaagttta gtcttttttg tcttttattt caggccccgg atccggtggt ggtgcaaatc 60

aaagaactgc tcctcagtcg atgttgccctt tacttctagg 100

<210> 8

<211> 147

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成聚核苷酸

<220>

<221> 未歸類的特徵

<223> BGH Poly A

<400> 8

cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg cccctccccc gtgccttcct 60

tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc ttctctaata aaatgaggaa attgcatcgc120

attgtctgag taggtgtcat tctattc147

<210> 9

<211> 141

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成聚核苷酸

<220>

<221> 未歸類的特徵

<223> 3' ITR

<400> 9

aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccc ggcggcctca gtgagcgagc120

gagcgcgcag agagggagtg g141

<210> 10

<211> 736

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> 未歸類的特徵

<223> scAAV9序列

<400> 10

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser

1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro

20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
260 265 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
275 280 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305 310 315 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
325 330 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
340 345 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
355 360 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
370 375 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<400> 11
cgctagcatc tcatcaggcc ttg 23

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<400> 12
agcatggaca gcagggtctg 20

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種編碼CLN3多肽的自身互補型重組腺相關病毒9(scAAV9)，其包括scAAV9基因組，所述scAAV9基因組以5'至3'的順序包括：包括SEQ ID NO: 3之核苷酸序列的P546啟動子；以及編碼SEQ ID NO: 1之所述CLN3多肽的聚核苷酸。

【請求項2】

如請求項1的scAAV9，其中所述scAAV9基因組以5'至3'的順序包括：包括SEQ ID NO: 3之核苷酸序列的P546啟動子；SV40內含子；以及編碼SEQ ID NO: 1之所述CLN3多肽的聚核苷酸。

【請求項3】

如請求項1的scAAV9，其中所述scAAV9基因組以5'至3'的順序包括：包括SEQ ID NO: 3之序列的P546啟動子；編碼SEQ ID NO: 1之所述CLN3多肽的聚核苷酸；以及牛生長激素聚腺苷酸化poly A序列。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項的scAAV9，其進一步包括兩個AAV末端反向重複。

【請求項5】

如請求項1至4中任一項的scAAV9，其中編碼所述CLN3多肽的所述聚核苷酸包括與SEQ ID NO: 2至少90%一致的序列。

【請求項6】

如請求項1至4中任一項的scAAV9，其中編碼所述CLN3多肽的所述聚核苷酸包括SEQ ID NO: 2的核酸序列。

【請求項7】

如請求項1至6中任一項的scAAV9，其中所述scAAV9基因組包括與SEQ ID NO: 4至少90%一致的核酸序列。

【請求項8】

如請求項1至6中任一項的scAAV9，其中所述scAAV9基因組包括與SEQ ID NO: 4至少95%一致的核酸序列。

【請求項9】

如請求項1至6中任一項的scAAV9，其中所述scAAV9基因組包括SEQ ID NO: 4的核酸序列。

【請求項10】

如請求項1至9中任一項的scAAV9，其中所述AAV末端反向重複係AAV2末端反向重複。

【請求項11】

如請求項1至10中任一項的scAAV9，其中所述rAAV9基因組包括單股基因組。

【請求項12】

一種核酸分子，其包括：第一AAV末端反向重複序列；包括SEQ ID NO: 3之序列的P546啟動子；編碼SEQ ID NO: 1之CLN3多肽的核酸序列；以及第二末端反向重複序列。

【請求項13】

如請求項12的核酸分子，其包括：第一AAV末端反向重複序列；包括SEQ ID NO: 3之核苷酸序列的P546啟動子；SV40內含子；編碼SEQ ID NO: 1之CLN3多肽的核酸序列；以及第二AAV末端反向重複序列。

【請求項14】

如請求項12的核酸分子，其包括：第一AAV末端反向重複序列；包括SEQ ID NO: 3之核苷酸序列的P546啟動子；編碼SEQ ID NO: 1之所述CLN3多肽的核酸；牛生長激素聚腺苷酸化poly A序列；以及第二AAV末端反向重複序列。

【請求項15】

如請求項12至14中任一項的核酸分子，其中編碼所述CLN3多肽的所述核酸包括與SEQ ID NO: 2至少90%一致的序列。

【請求項16】

如請求項12至14中任一項的核酸分子，其中編碼所述CLN3多肽的所述核酸包括SEQ ID NO: 2的核酸序列。

【請求項17】

如請求項12至16中任一項的核酸分子，其包括與SEQ ID NO: 4的核酸序列至少90%一致的核酸序列。

【請求項18】

如請求項12至16中任一項的核酸分子，其包括與SEQ ID NO: 4的核酸序列至少95%一致的核酸序列。

【請求項19】

如請求項12至17中任一項的核酸分子，其包括SEQ ID NO: 4的核酸序列。

【請求項20】

如請求項15至20中任一項的核酸分子，其中所述AAV末端反向重複係AAV2末端反向重複。

【請求項21】

一種自身互補型重組腺相關病毒9(scAAV9)，其包括如請求項12至20中任一項的核酸分子。

【請求項22】

如請求項21的scAAV9，其中所述scAAV9包括單股基因組。

【請求項23】

一種rAAV顆粒，其包括如請求項12至20中任一項的核酸分子。

【請求項24】

如請求項23的rAAV顆粒，其中所述rAAV顆粒包括單股基因組。

【請求項25】

一種編碼CLN3多肽的重組腺相關病毒9(rAAV9)病毒顆粒，其包括rAAV9基因組，所述rAAV9基因組以5'至3'的順序包括：P546啟動子及編碼所述CLN3多肽的聚核苷酸。

【請求項26】

如請求項25的rAAV9病毒顆粒，其中所述rAAV9基因組包括自身互補型基因組。

【請求項27】

如請求項25的rAAV9病毒顆粒，其中所述rAAV9基因組包括單股基因組。

【請求項28】

如請求項25至27中任一項的rAAV9病毒顆粒，其中所述rAAV9基因組以5'至3'的順序包括：第一AAV末端反向重複；所述P546啟動子；編碼所述CLN3多肽的所述聚核苷酸；以及第二AAV末端反向重複。

【請求項29】

如請求項25至28中任一項的rAAV9病毒顆粒，其中所述P546啟動子包括與SEQ ID NO: 3的核酸序列至少90%一致的序列。

【請求項30】

如請求項25至29中任一項的rAAV9病毒顆粒，其中所述CLN3多肽包括與SEQ ID NO: 1的核酸序列至少90%一致的序列。

【請求項31】

如請求項25至30中任一項的rAAV9病毒顆粒，其中編碼所述CLN3多肽的所述聚核苷酸包括與SEQ ID NO: 2的核酸序列至少90%一致的序列。

【請求項32】

如請求項25至31中任一項的rAAV9病毒顆粒，其中所述rAAV9基因組包括與SEQ ID NO: 4的核酸序列至少90%一致的序列。

【請求項33】

如請求項25至31中任一項的rAAV9病毒顆粒，其中所述rAAV9基因組包括與SEQ ID NO: 4的核酸序列至少95%一致的序列。

【請求項34】

如請求項28至33中任一項的rAAV9病毒顆粒，其中所述AAV末端反向重複係AAV2末端反向重複。

【請求項35】

如請求項25至34中任一項的rAAV9病毒顆粒，其中所述rAAV9基因組進一步包括SV40內含子。

【請求項36】

如請求項25至35中任一項的rAAV9病毒顆粒，其中所述rAAV9基因組進一步包括BGH poly-A序列。

【請求項37】

一種核酸分子，其包括rAAV9基因組，所述rAAV9基因組以5'至3'的順序包括：第一AAV末端反向重複；P546啟動子；編碼CLN3多肽的聚核苷酸；以及第二AAV末端反向重複。

【請求項38】

如請求項37的核酸分子，其中所述rAAV9包括自身互補型基因組。

【請求項39】

如請求項37的核酸分子，其中所述rAAV9包括單股基因組。

【請求項40】

如請求項37至39中任一項的核酸分子，其中所述rAAV9基因組以5'至3'的順序包括：第一AAV末端反向重複；所述P546啟動子；編碼所述CLN3多肽的所述聚核苷酸；以及第二AAV末端反向重複。

【請求項41】

如請求項37至40中任一項的核酸分子，其中所述P546啟動子包括與SEQ ID NO: 3的核酸序列至少90%一致的序列。

【請求項42】

如請求項37及41中任一項的核酸分子，其中所述CLN3多肽包括與SEQ ID NO: 1的核酸序列至少90%一致的序列。

【請求項43】

如請求項37至42中任一項的核酸分子，其中編碼所述CLN3多肽的所述聚核苷酸包括與SEQ ID NO: 2的核酸序列至少90%一致的序列。

【請求項44】

如請求項37至43中任一項的核酸分子，其中所述rAAV9基因組包括與SEQ ID NO: 4的核酸序列至少95%一致的序列。

【請求項45】

如請求項37至44中任一項的核酸分子，其中所述AAV末端反向重複係AAV2末端反向重複。

【請求項46】

如請求項37至45中任一項的核酸分子，其中所述rAAV9基因組包括與SEQ ID NO: 4的核酸序列至少90%一致的序列。

【請求項47】

如請求項37至46中任一項的核酸分子，其中所述rAAV9基因組進一步包括SV40內含子。

【請求項48】

如請求項37至47中任一項的核酸分子，其中所述rAAV9基因組進一步包括牛生長激素(BGH)poly-A序列。

【請求項49】

一種組合物，其包括：如請求項1至11、21或22中任一項的scAAV；如請求項12至20或37至48中任一項的核酸分子；如請求項23至36中任一項的rAAV9病毒顆粒；以及藥學上可接受之賦形劑、載劑或稀釋劑。

【請求項50】

如請求項49的組合物，其中所述賦形劑包括非離子低滲透化合物、緩衝液、聚合物、鹽或其組合。

【請求項51】

一種治療受試者之CLN3型巴藤病(CLN3-Batten Disease)的方法，其包括向所述受試者投與組合物，所述組合物包括治療有效量的如請求項1至12、21或22中任一項的scAAV的組合物；如請求項12至20或37至48中任一項的核酸分子；如請求項23至36中任一項的rAAV9病毒顆粒；如請求項37至48中任一項的核酸；或如請求項49或50的組合物。

【請求項52】

如請求項51的方法，其中所述組合物藉由選自由以下組成之群的途徑投與：鞘內、腦室內、腦實質內、靜脈內及其組合。

【請求項53】

如請求項51的方法，其中所述組合物藉由鞘內投與。

【請求項54】

如請求項51的方法，其中所述組合物藉由腦室內投與。

【請求項55】

如請求項51的方法，其中所述組合物藉由靜脈內投與。

【請求項56】

如請求項51或55中任一項的方法，其中投與約 1×10^{12} 至約 1×10^{15} vg的所述rAAV9病毒顆粒被。

【請求項57】

如請求項51或56中任一項的方法，其中投與約 6×10^{13} 至約 1.2×10^{14} 的所述rAAV9病毒顆粒。

【請求項58】

如請求項51至57中任一項的方法，其中所述治療減少CLN3型巴藤病的一種或多種症狀，所述症狀選自：

- (a)自發螢光儲存材料的溶酶體聚集減少或減緩，
- (b)ATP合成酶亞單位C的溶酶體聚集減少或減緩，
- (c)膠質細胞活化(星形膠質細胞及/或小膠質細胞)活化減少或減緩，
- (d)星形細胞增生減少或減緩，
- (e)藉由MRI測量的腦量損失減少或減緩，
- (f)癲癇發作減少或減緩，
- (g)UBDRS評估量表中的一項或多項穩定、進展減少或延遲、或改善，其中所述減少、穩定或改善係與所述組合物投與之前的所述受試者或未經治療的CLN3型巴藤病患者相比而言的。

【請求項59】

如請求項51至58中任一項的方法，其進一步包括在投與所述rAAV9病毒顆粒後將所述受試者置於特倫德倫伯格位置(Trendelenberg position)。

【請求項60】

一種治療有需要之受試者的CLN3疾病的方法，其包括組合物遞送至有需要之受試者的腦或脊髓，所述組合物包括：如請求項1至12、21或22中任一項的scAAV；如請求項12至20或37至48中任一項的核酸分子；如請求項23至36中任一項的rAAV9病毒顆粒。

【請求項61】

如請求項60的方法，其中所述組合物藉由鞘內注射、腦室內注射、腦實質內注射、靜脈內注射或其組合來遞送。

【請求項62】

如請求項61的方法，其進一步包括在鞘內注射所述組合物後將所述受試者置於特倫德倫伯格位置。

【請求項63】

如請求項60至62中任一項的方法，其中所述組合物包括非離子低滲透造影劑。

【請求項64】

如請求項63的方法，其中所述非離子低滲透造影劑選自由以下組成之群：碘比醇(iobitridol)、碘海醇(iohexol)、碘美普爾(iomeprol)、碘帕醇(iopamidol)、碘噴托(iopentol)、碘普胺(iopromide)、碘佛醇(ioversol)、碘昔蘭(ioxilan)及其組合。

【請求項65】

如請求項60至64中任一項的方法，其中遞送至所述腦或脊髓包括遞送至腦幹。

【請求項66】

如請求項60至64中任一項的方法，其中遞送至所述腦或脊髓包括遞送至小腦。

【請求項67】

如請求項60至64中任一項的方法，其中遞送至所述腦或脊髓包括遞送至視覺皮質。

【請求項68】

如請求項60至64中任一項的方法，其中遞送至所述腦或脊髓包括遞送至運動皮質。

【請求項69】

如請求項60至64中任一項的方法，其中遞送至所述腦或脊髓包括遞送至神經細胞、神經膠質細胞或兩者。

【請求項70】

如請求項60至69中任一項的方法，其中遞送至所述腦或所述脊髓包括遞送至神經元、下運動神經元、小神經膠質細胞、少突膠質細胞、星形膠質細胞、許旺氏細胞(Schwann cell)或其組合。

【請求項71】

如請求項60至70中任一項的方法，其中所述治療產生以下中的一種或多種：

- (a)自發螢光儲存材料的溶酶體聚集減少，
- (b)ATP合成酶亞單位C的溶酶體聚集減少，
- (c)膠質細胞活化(星形膠質細胞及/或小膠質細胞)活化減少，
- (d)星形細胞增生減少，
- (e)藉由MRI測量的腦量損失減少，
- (f)癲癇發作減少，以及

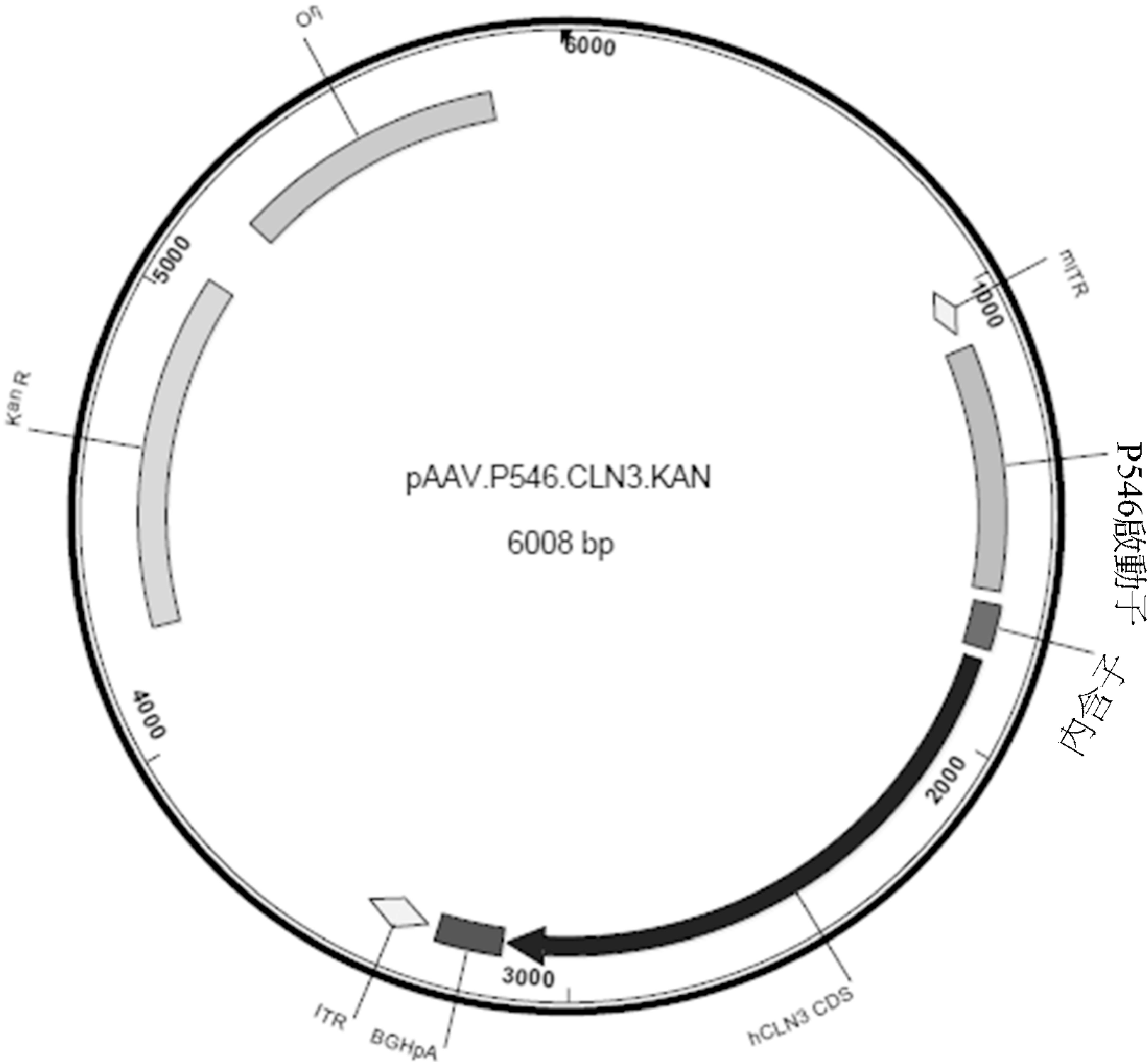
(g)UBDRS評估量表中的一項或多項穩定、進展減少或改善，其中所述減少、穩定或改善係與所述組合物遞送之前的所述受試者或未經治療的CLN3型巴藤病患者相比而言的。

【發明圖式】

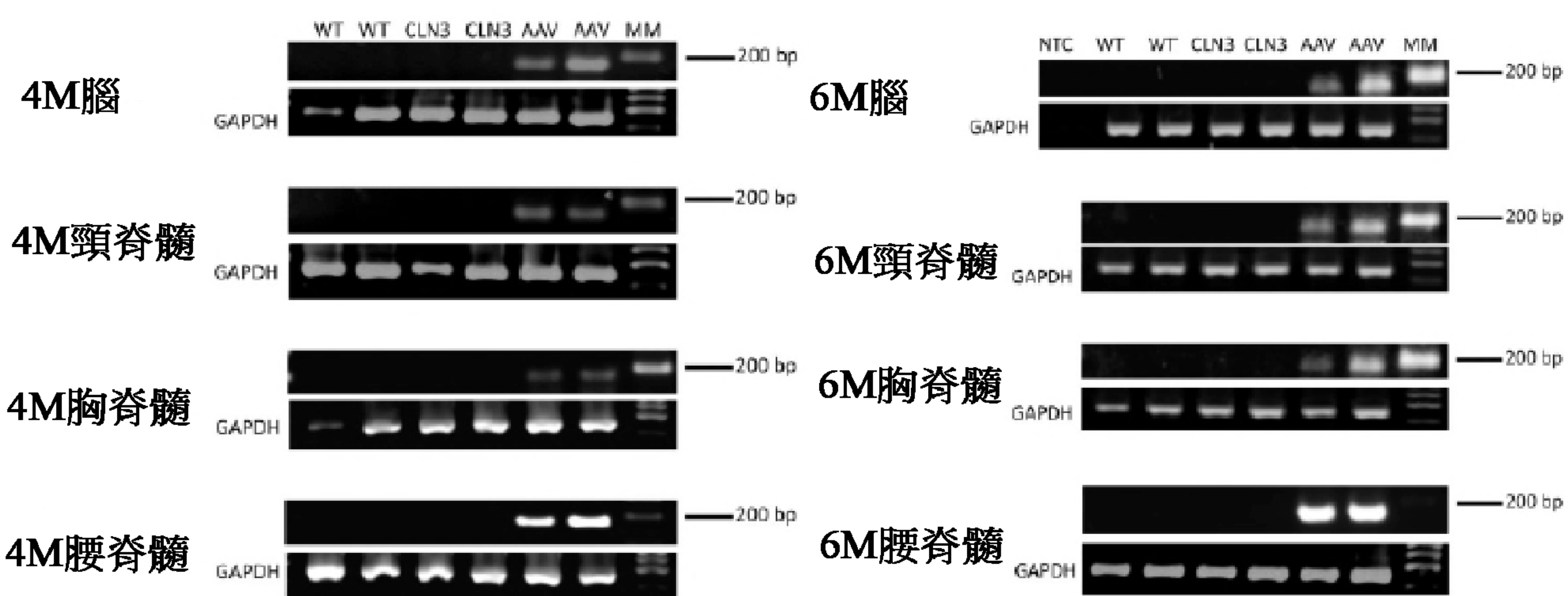
A



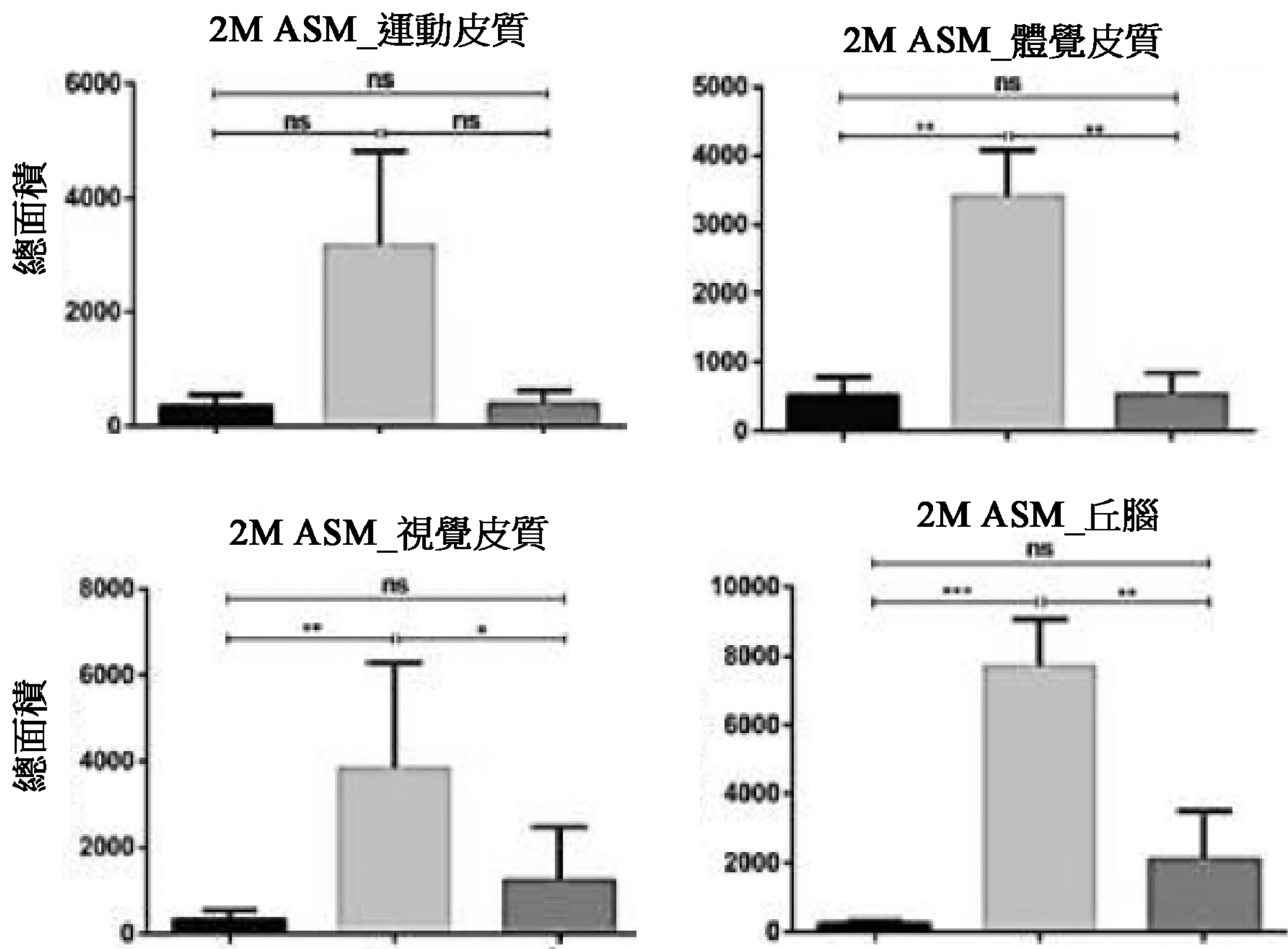
B



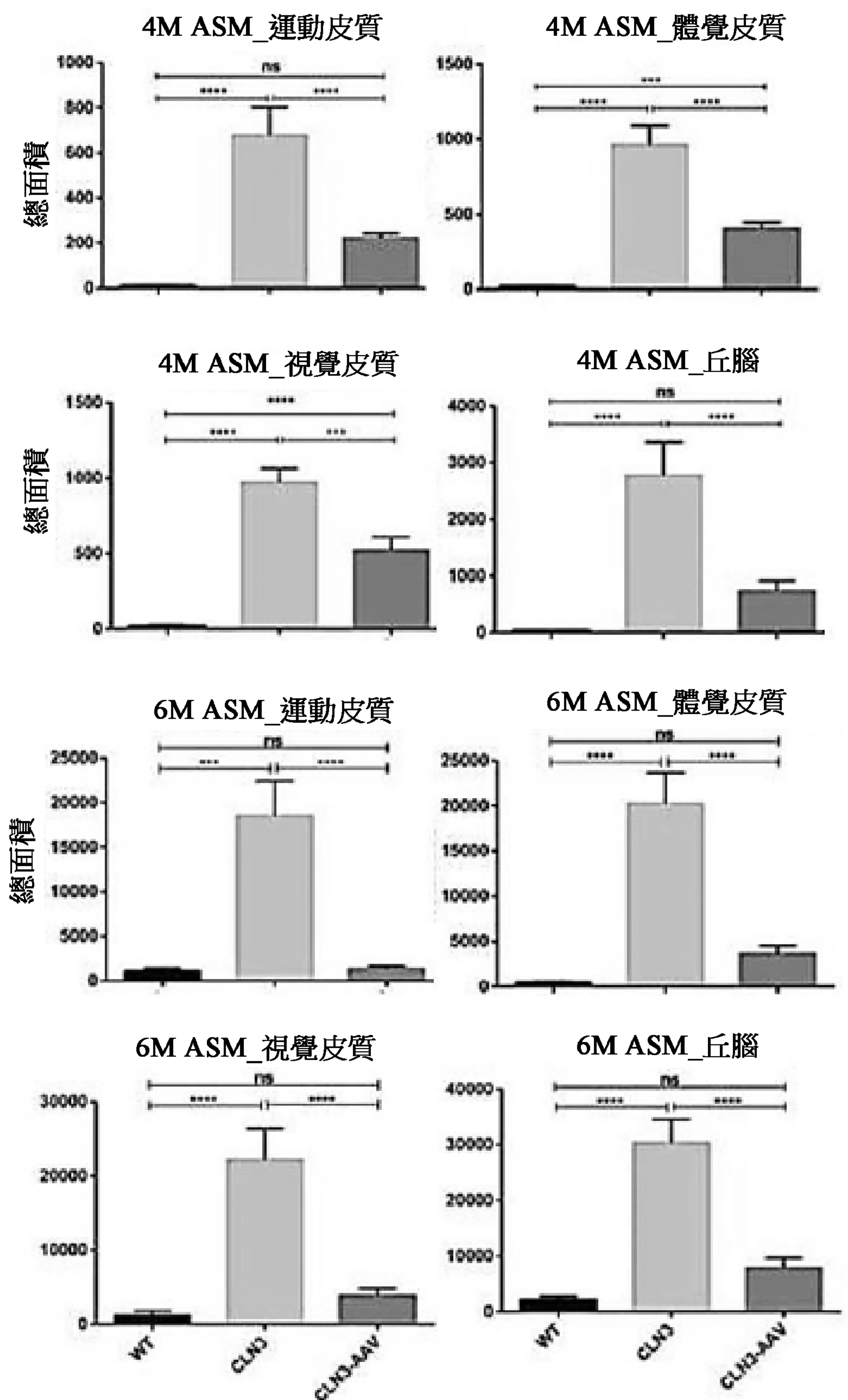
【圖1】



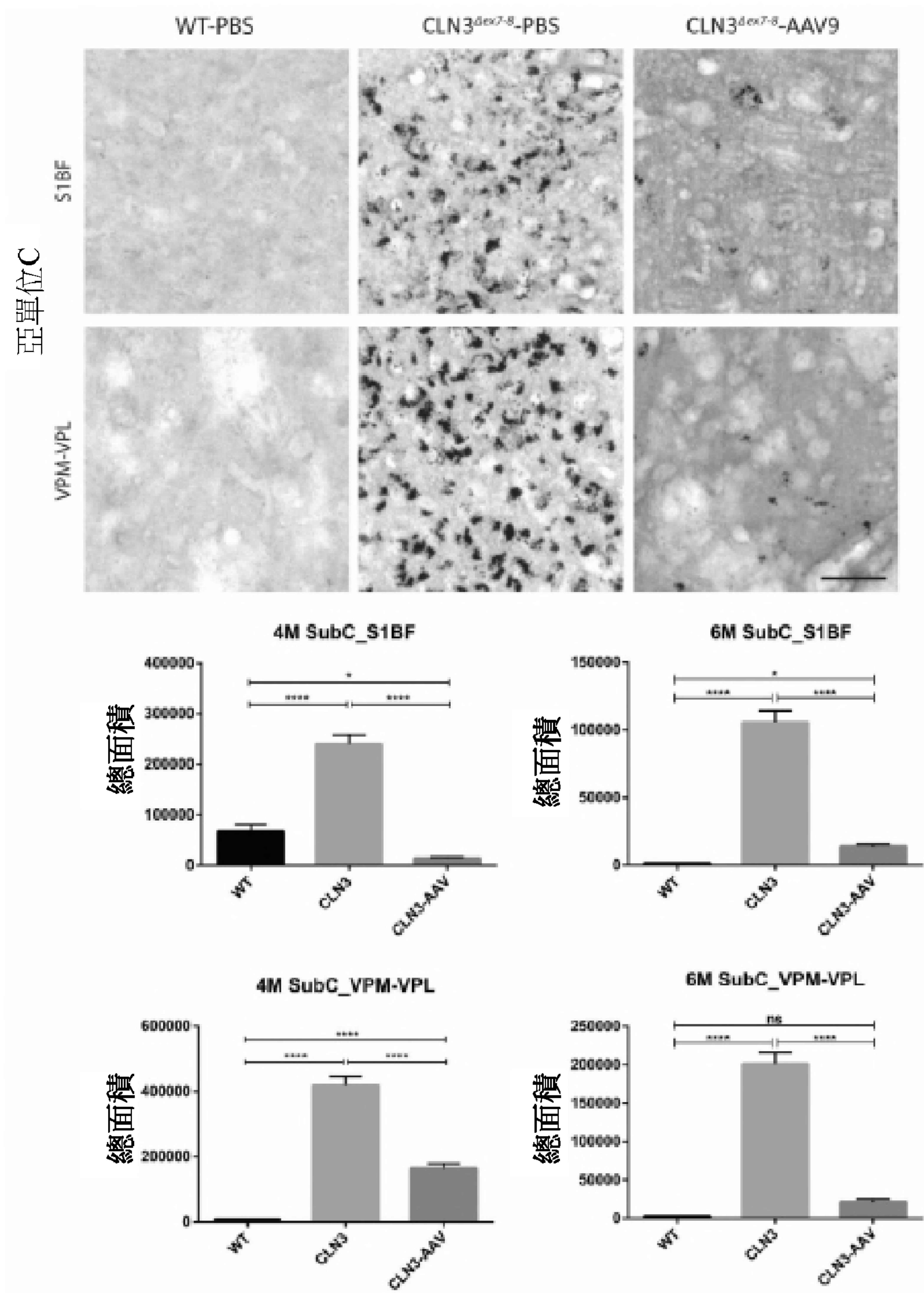
【圖2】



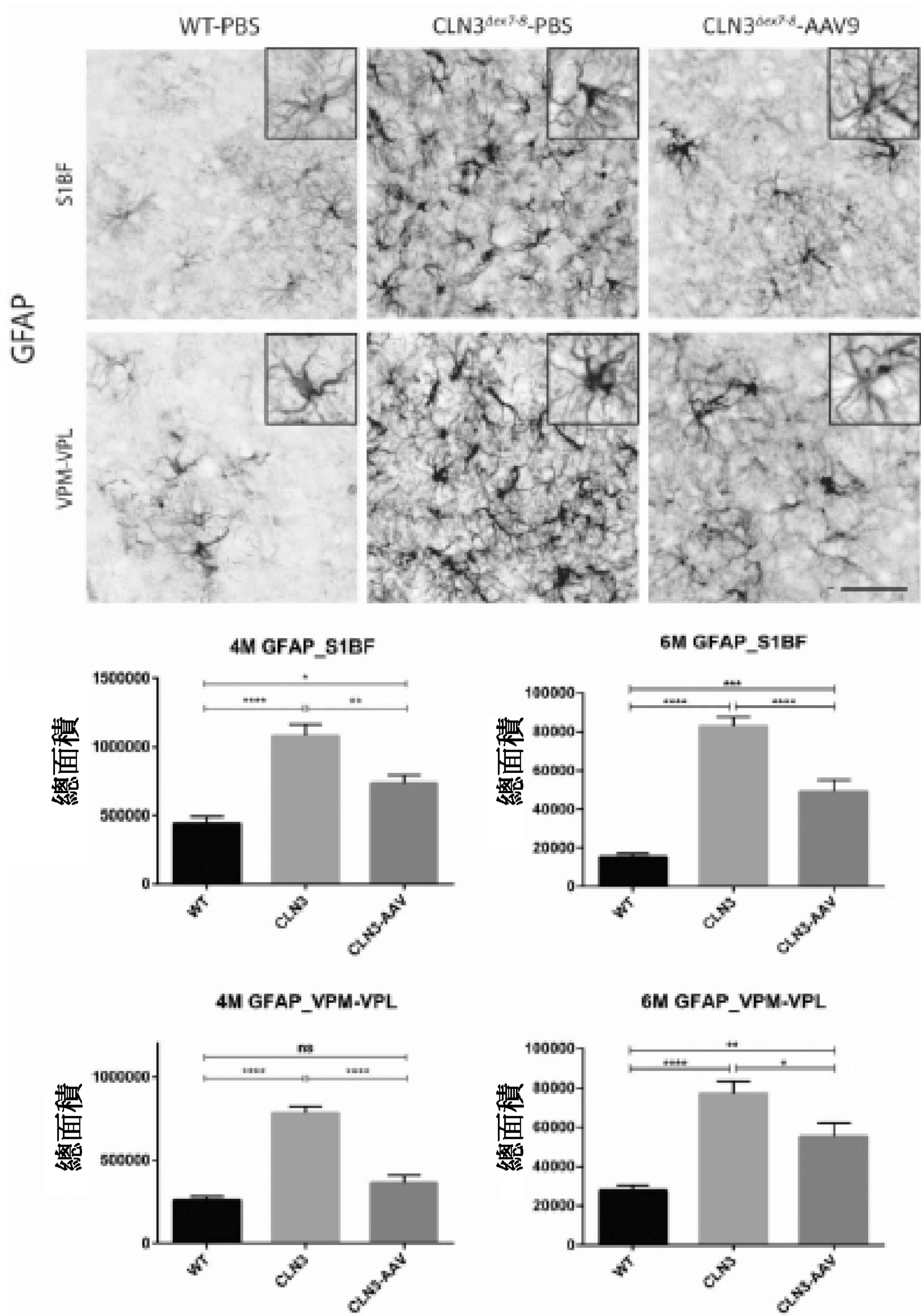
【圖3】



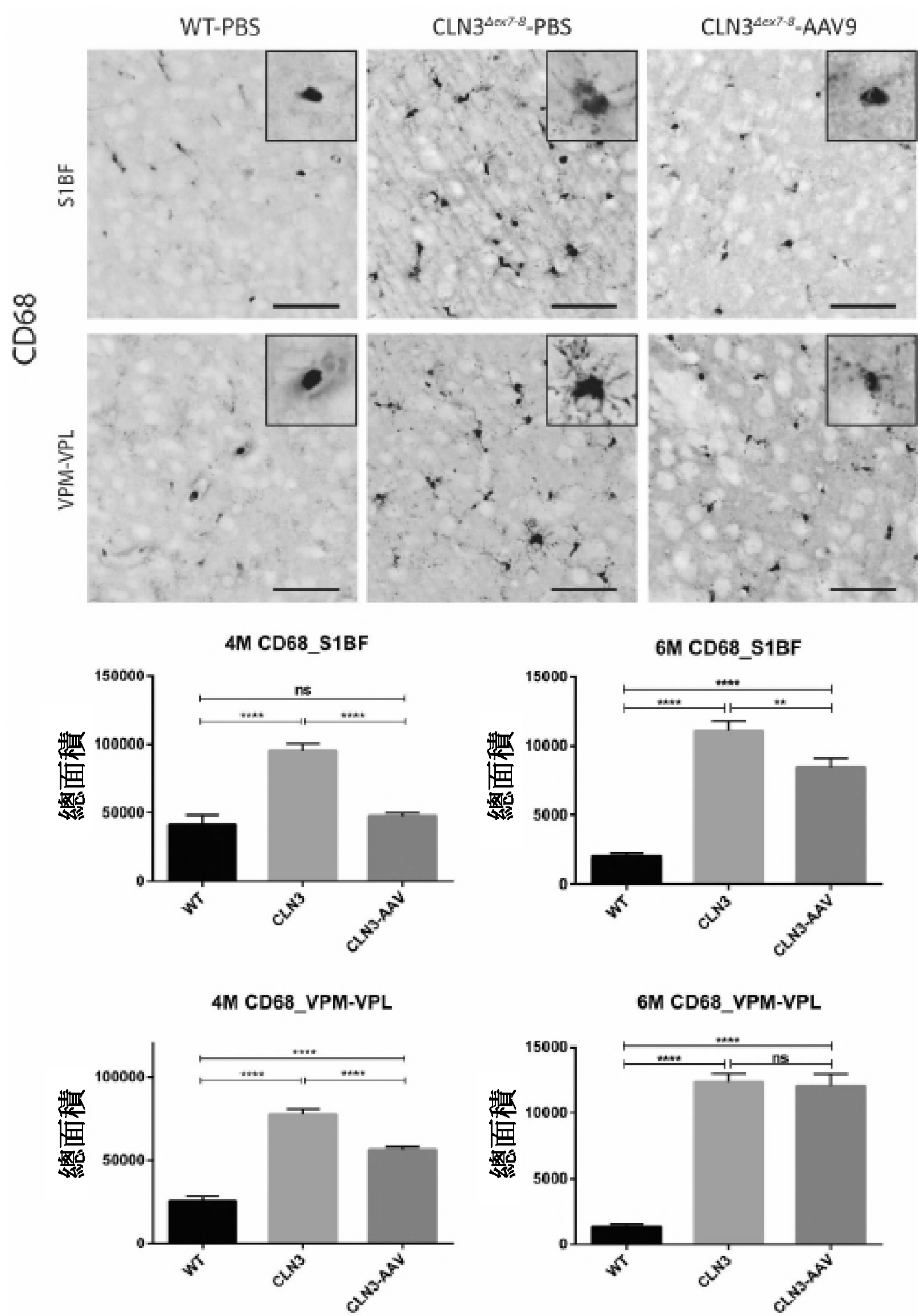
【圖4】



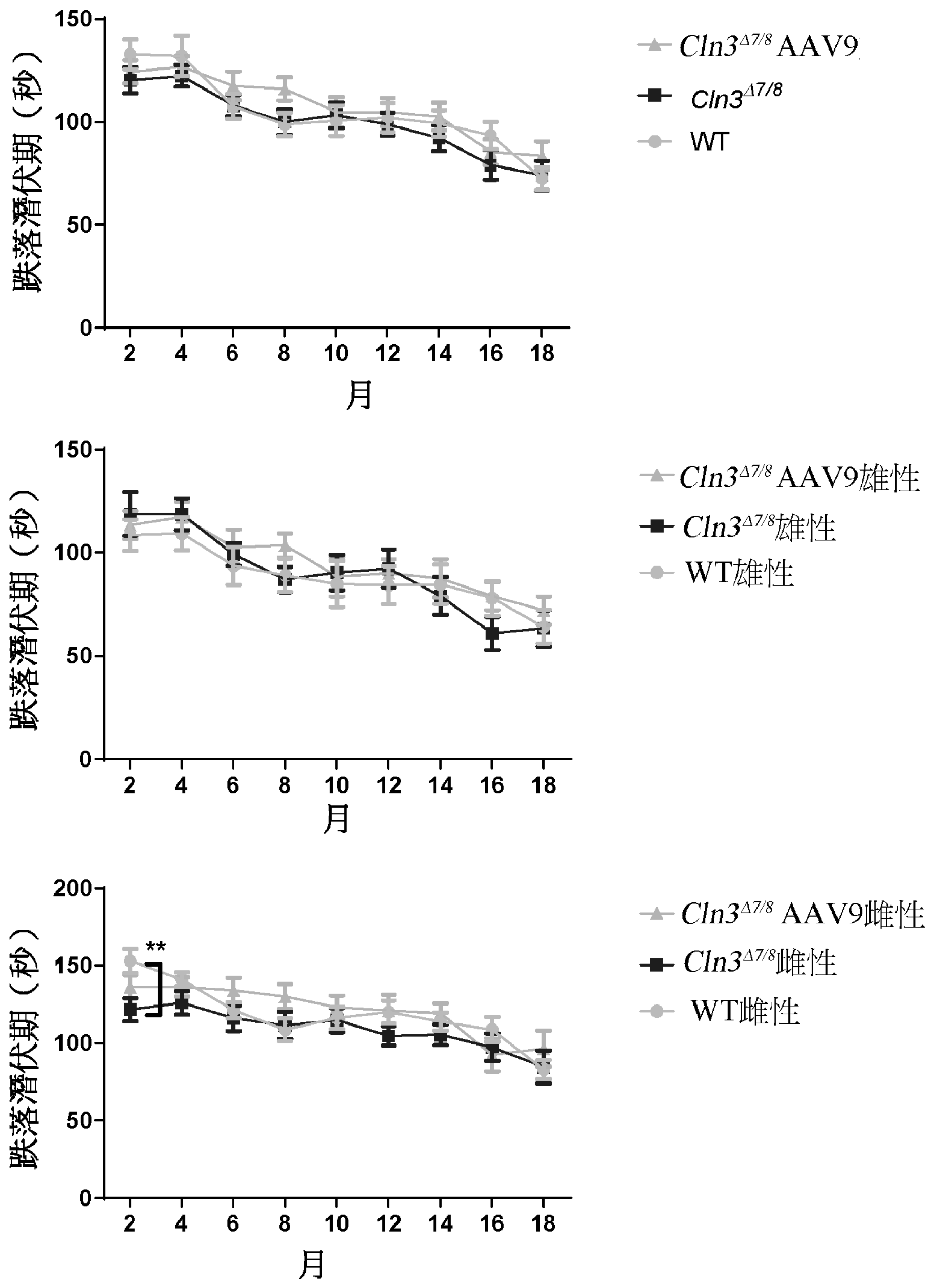
【圖5】



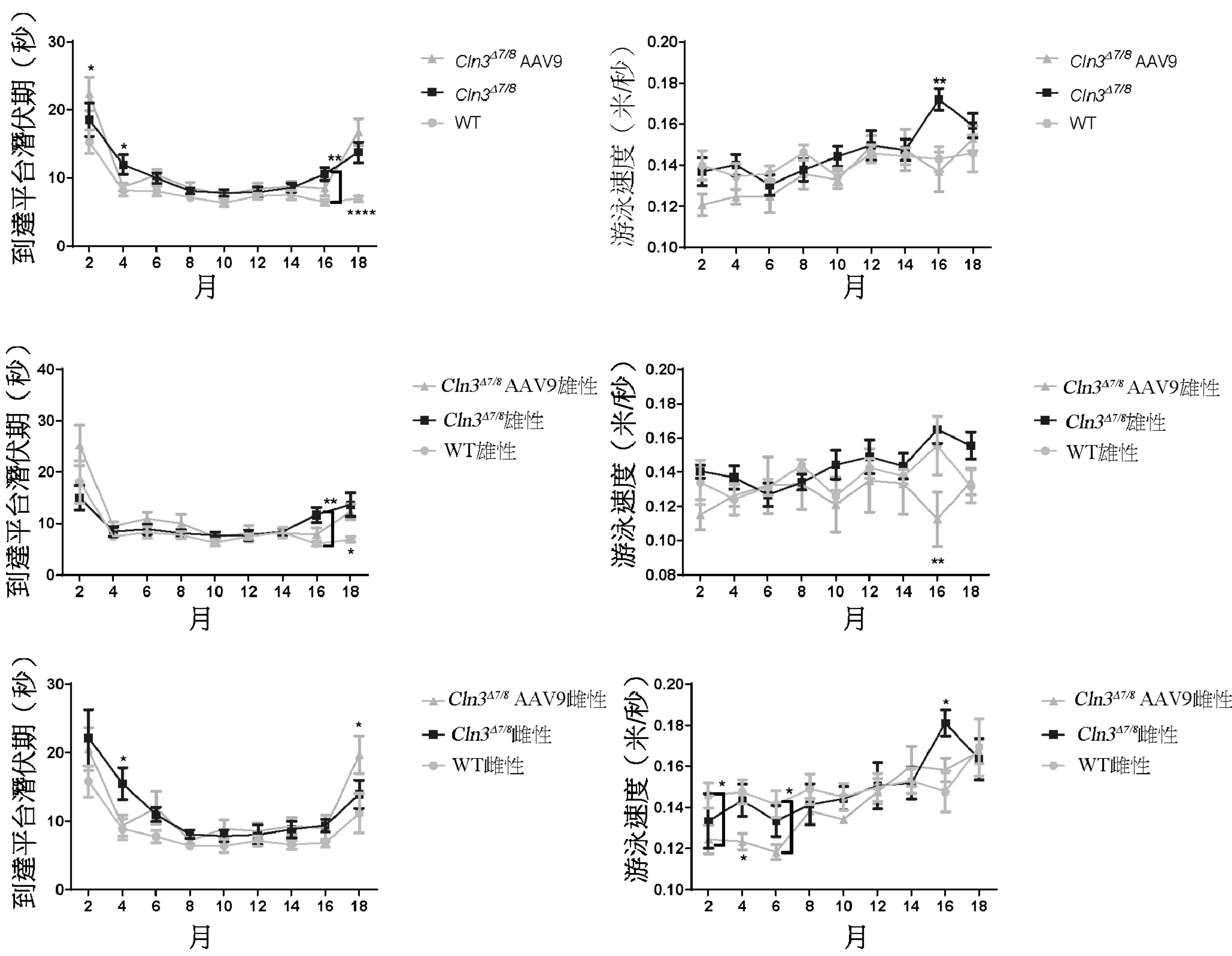
【圖6】



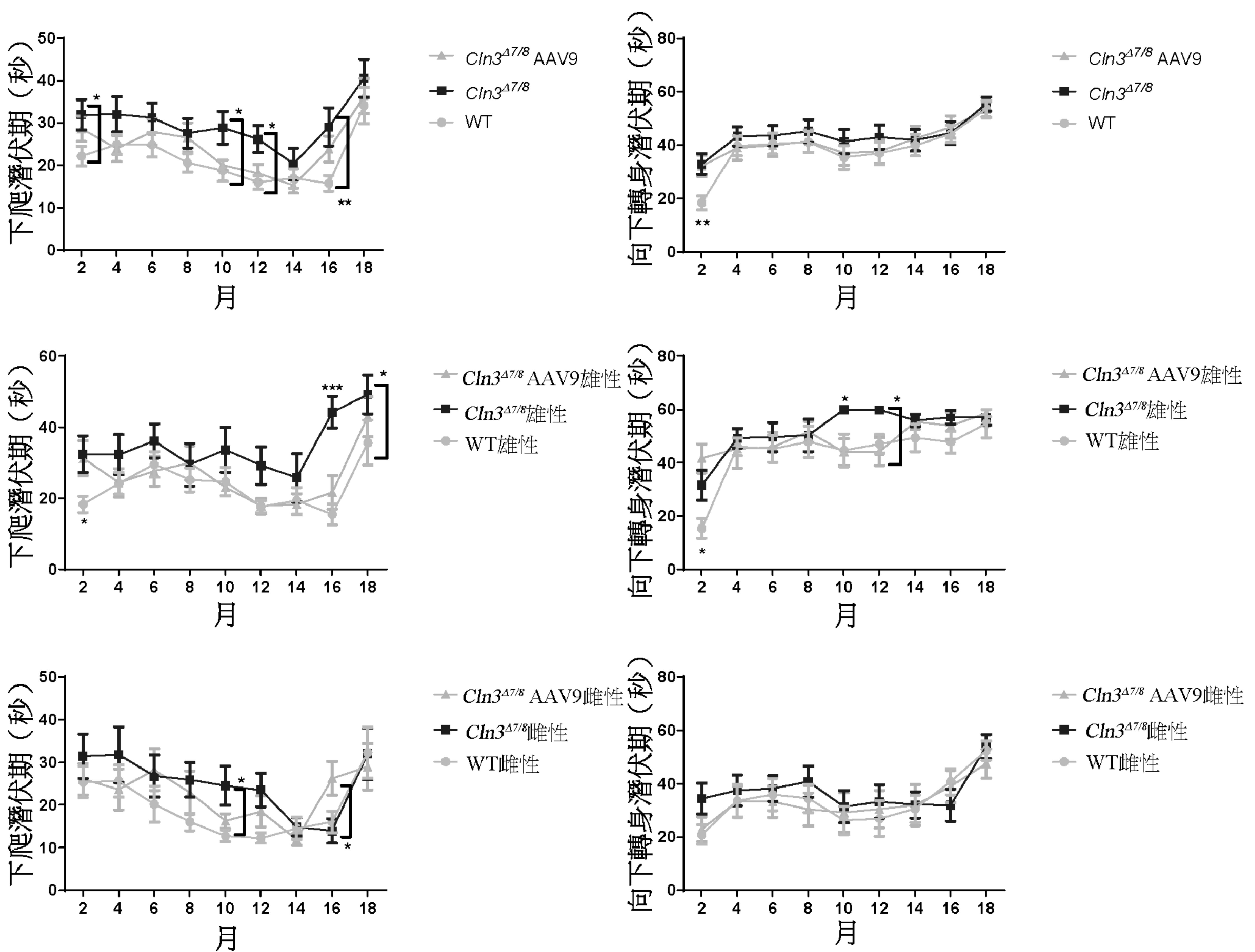
【圖7】



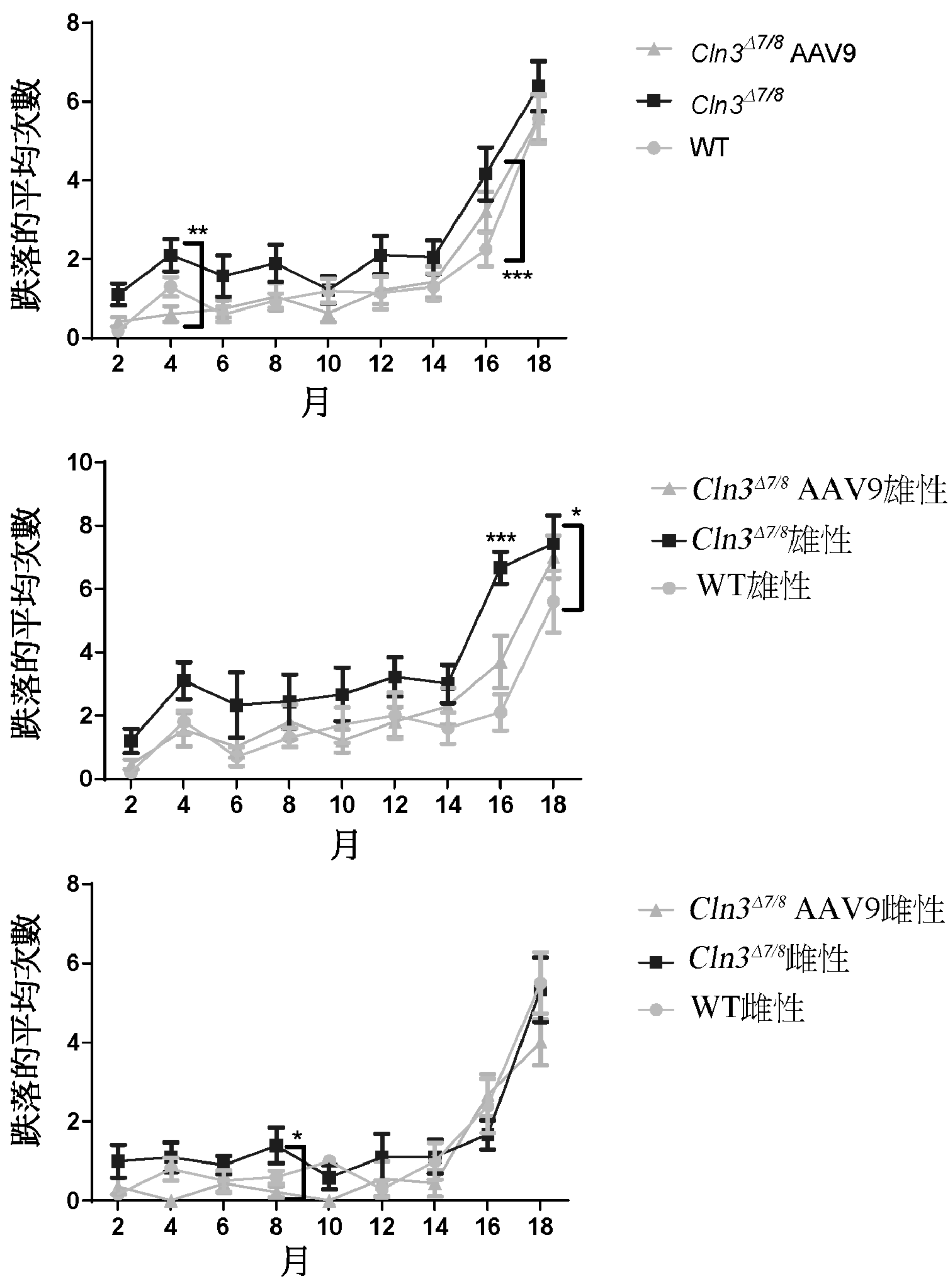
【圖8】



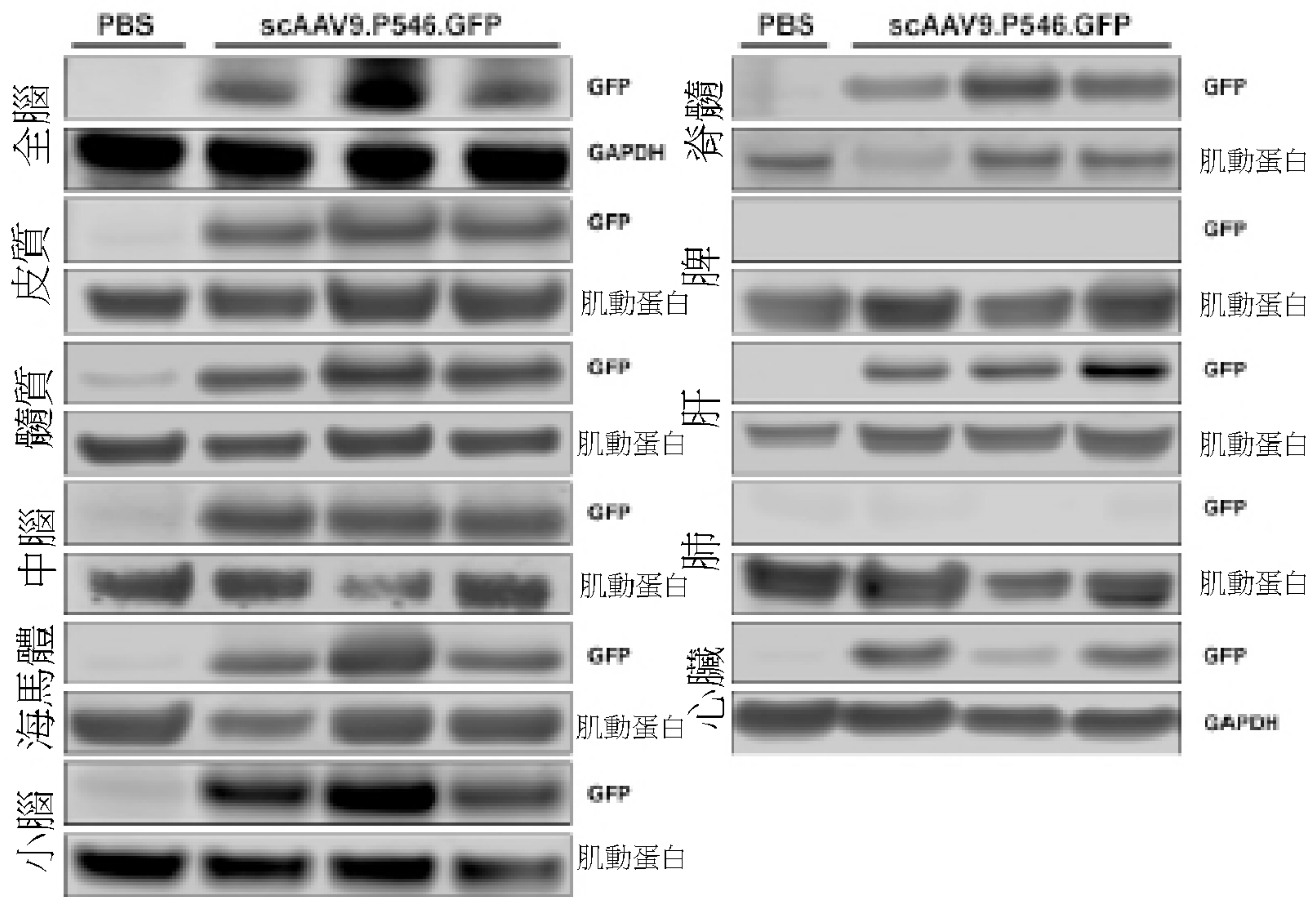
【圖9】



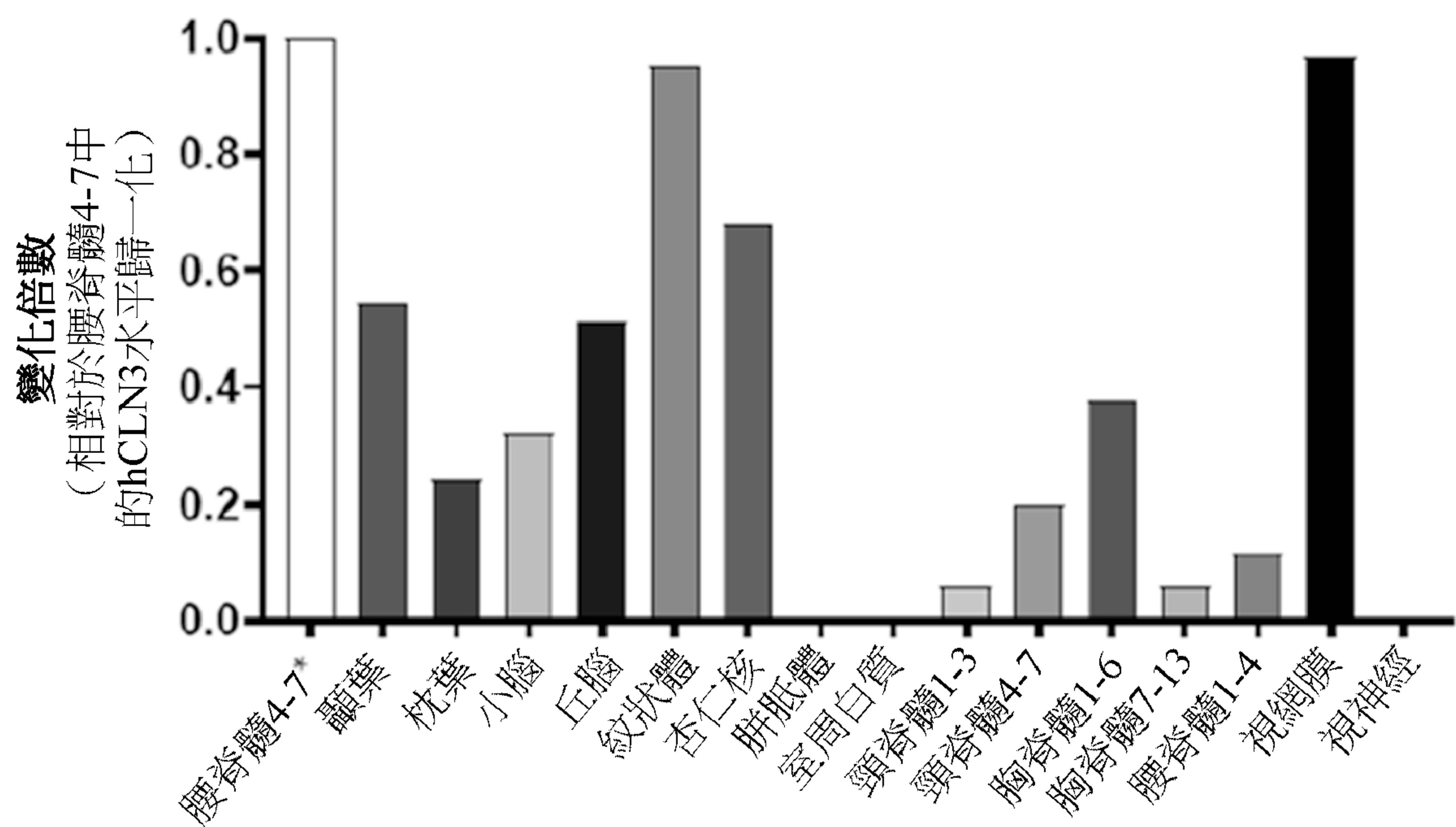
【圖10】



【圖11】



【圖12】



【圖13】

(SEQ ID NO: 4)
CLN3 - scAAV9.P546.CLN3

AAV2 ITR—P546—SV40內含子—人類CLN3 cDNA —B.GHpolyA—AAV2 ITR

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCT
CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGAATTCAATTCACGCGCCGGTACCGAATTCACGCGTGAAC
AACGCCAGGCTCCTCAACAGGCAACTTTGCTACTTCTACAGAAAATGATAATAAAGAAATGCTGGTGAAGTCA
AATGCTTATCACAATGGTGAAGTACTCAGCAGGGAGGCTCTAATAGGCGCCAAGAGCCTAGACTTCCTTAAGC
GCCAGAGTCCACAAGGGGCCAGTTAATCCTCAACATTCAAATGCTGCCACAAAACCAGCCCCTCTGTGCCCTA
GCCGCCTCTTTTTTCCAAGTGACAGTAGAACTCCACCAATCCGCAGCTGAATGGGGTCCGCCTCTTTTCCCTGCC
TAAACAGACAGGAACTCCTGCCAATTGAGGGCGTCACCGCTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACCA
ATGAAGGGTAATCTCGACAAAGAGCAAGGGGTGGGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCACACAGGCTGGT
CGGGAGGGGCGGGGCGCGACGTCTGCCGTGCGGGGTCCCGGCATCGGTTGCGCGCGCGCTCCCTCCTCTCGGA
GAGAGGGCTGTGGTAAAACCCGTCCGGAAAACGCGTCGAAGGGCGAATTCTGCAGATAACTGGTAAGTTTAG
TCTTTTTTGTCTTTATTTAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTCGATGTTG
CCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTACCGGTATGGGAGGCTGTGCAGGCTCGCGGCGGCGCTTTT
CGGATTCCGAGGGGGAGGAGACCGTCCCGGAGCCCCGGCTCCCTCTGTTGGACCATCAGGGCGCGCATTGG
AAGAACGCGGTGGGCTTCTGGCTGCTGGGCCTTTGCAACAACTTCTCTTATGTGGTGATGCTGAGTGCCGCC
ACGACATCCTTAGCCACAAGAGGACATCGGGAAACCAGAGCCATGTGGACCCAGGCCCAACGCCGATCCCC
ACAACAGCTCATCAGATTTGACTGCAACTCTGTCTCTACGGCTGCTGTGCTCCTGGCGGACATCCTCCCCACA
CTCGTCATCAAATTGTTGGCTCCTCTTGGCCTTCACTGCTGCCCTACAGCCCCGGGTTCTCGTCAGTGGGAT
TTGTGCTGCTGGAAGCTTCGTCCTGGTTGCCTTTTCTCATTCTGTGGGGACCAGCCTGTGTGGTGTGGTCTTCG
CTAGCATCTCATCAGGCCTTGGGGAGGTACCTTCTCTCCCTCACTGCCTTCTACCCAGGGCCGTGATCTCC
TGGTGGTCCTCAGGGAAGTGGGGGAGCTGGGCTGCTGGGGGCCCTGTCCTACCTGGGCCTCACCCAGGCCGG
CCTCTCCCCTCAGCAGACCCTGCTGTCCATGCTGGGTATCCCTGCCCTGCTGCTGGCCAGCTATTTCTTGTTGCT
CACATCTCCTGAGGCCAGGACCCTGGAGGGGAAGAAGAAGCAGAGAGCGCAGCCCGGCAGCCCCTCATAA
GAACCGAGGCCCGGAGTCGAAGCCAGGCTCCAGCTCCAGCCTCTCCCTTCGGGAAAGGTGGACAGTGTTCA
AGGGTCTGCTGTGGTACATTGTTCCCTTGGTCGTAGTTTACTTTGCCGAGTATTTCATTAAACCAGGGACTTTTT
GAACTCCTCTTTTTCTGGAACACTTCCCTGAGTCACGCTCAGCAATACCGCTGGTACCAGATGCTGTACCAGG
CTGGCGTCTTTGCCTCCCGCTCTTCTCTCCGCTGCTGTGCGCATCCGTTTACCTGGGCCCTGGCCCTGCTGCAGT
GCCTCAACCTGGTGTTCTGCTGGCAGACGTGTGGTTCGGCTTTCTGCCAAGCATCTACCTCGTCTTCTGATC
ATTCTGTATGAGGGGCTCCTGGGAGGCGCAGCCTACGTGAACACCTTCCACAACATCGCCCTGGAGACCAGT
GATGAGCACCGGGAGTTTGCAATGGCGGCCACCTGCATCTCTGACACACTGGGGATCTCCCTGTCGGGGGCTC
CTGGCTTTGCCTCTGCATGACTTCCTCTGCCAGCTCTCCTGACCTGCAGGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCA
GCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTTCTAATAA
AATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTTCGCATGCTGGGGAGAGATCGATCTGAGG
AACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTC
GCCCCAGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGG

【圖14】

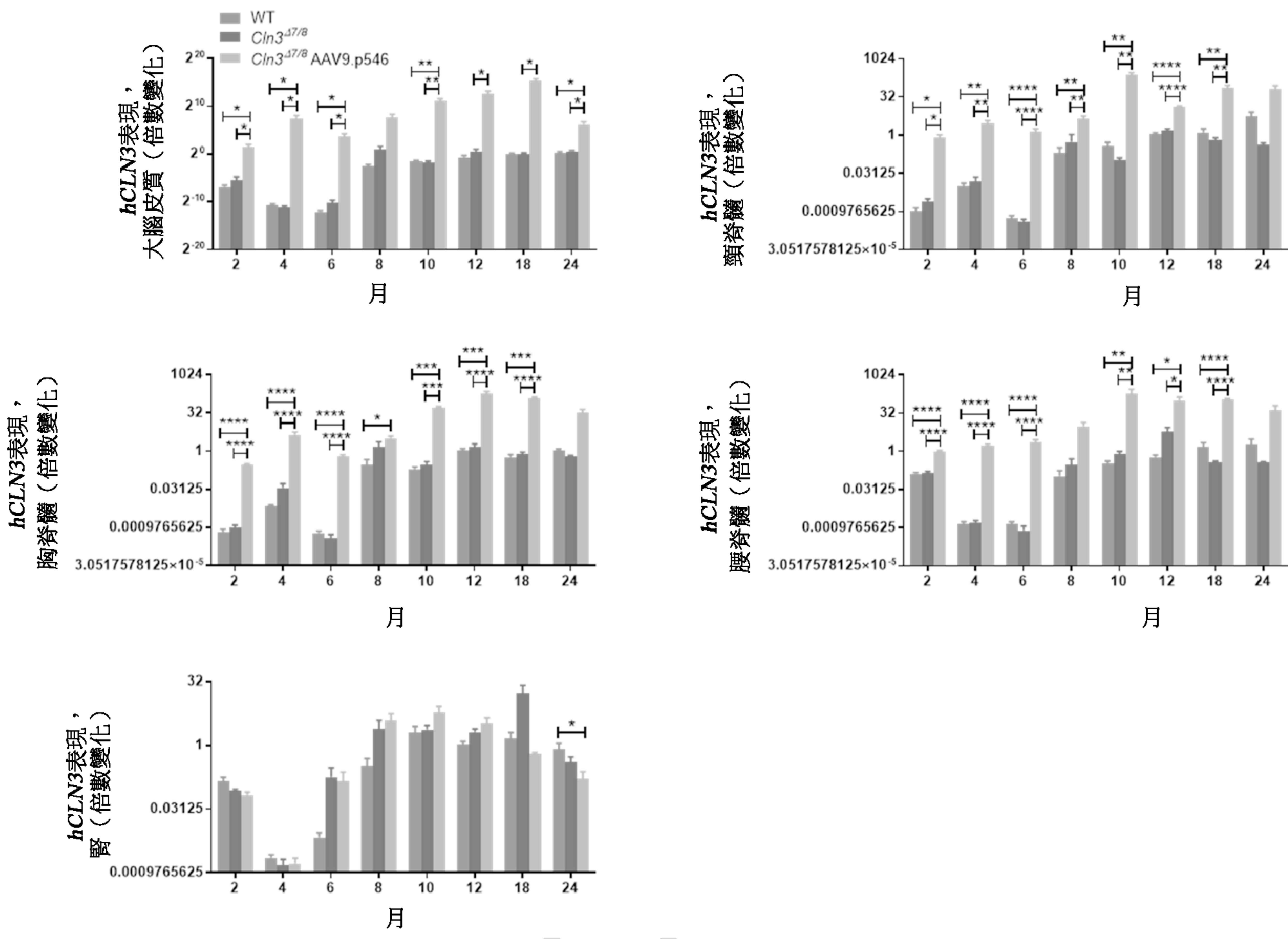
(SEQ ID NO: 5)

完整AAV.546.CLN3
GCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCC
GCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGATTCCGTTGCAATGGCTGGCGGTAAT
ATTGTTCTGGATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTTCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATTAATAATCAAAG
AAGTATTGCGACAACGGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTACTCGGTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTT
CTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTAAAATCCCTTTAATCGGCCTCCTGTTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAACG
AGGAAAGCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGT
GTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTT
TCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTAC
GGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCG
CCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGG
TCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTTGCGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTA
ACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAAATATTTGCTTATAACAATCTTCCTGTTTTTGGGGCTTTTCT
GATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATTACCGTTCATCGCCCTGCGCGCTCGCTCGCTC
ACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG
CAGAGAGGGAGTGGAATTCAATTCACGCGCCGGTACCGAATTCACGCGTGAACAACGCCAGGCTCCTCAACAGGC
AACTTTGCTACTTCTACAGAAAATGATAATAAAGAAATGCTGGTGAAGTCAAATGCTTATCACAATGGTGAACACTAC
TCAGCAGGGAGGCTCTAATAGGCGCCAAGAGCCTAGACTTCCTTAAGCGCCAGAGTCCACAAGGGGCCAGTTAAT
CCTCAACATTCAAATGCTGCCCACAAAACCAGCCCCTCTGTGCCCTAGCCGCCTCTTTTTTCCAAGTGACAGTAGAA
CTCCACCAATCCGCAGCTGAATGGGGTCCGCCTCTTTTCCCTGCCTAAACAGACAGGAACTCCTGCCAATTGAGGG
CGTCAACCGCTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACCAATGAAGGGTAATCTCGACAAAGAGCAAGGGGTG
GGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCACACAGGCTGGTCGGGAGGGCGGGGCGCGACGTCTGCCGTGCGGGG
TCCCCGGCATCGGTTGCGCGCGCGCTCCCTCCTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGTAAAACCCGTCCGGAAAACGCGTC
GAAGGGCGAATTCTGCAGATAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTTGTCTTTTATTTCAAGTCCCGGATCCGGTGGTGGT
GCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTCGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTACCGGTATGG
GAGGCTGTGCAGGCTCGCGGCGGCGCTTTTCGGATTCCGAGGGGGAGGAGACCGTCCCGGAGCCCCGGCTCCCT
CTGTTGGACCATCAGGGCGCGCATTGGAAGAACGCGGTGGGCTTCTGGCTGCTGGGCCTTTGCAACAACCTTCTCTT
ATGTGGTGATGCTGAGTGCCGCCACGACATCCTTAGCCACAAGAGGACATCGGGAAACCAGAGCCATGTGGACC
CAGGCCCCAACGCCGATCCCCACAACAGCTCATCACGATTTGACTGCAACTCTGTCTCTACGGCTGCTGTGCTCCTG
GCGGACATCCTCCCCACACTCGTCATCAAATTGTTGGCTCCTCTTGGCCTTCACCTGCTGCCCTACAGCCCCCGGGT
TCTCGTCAGTGGGATTTGTGCTGCTGGAAGCTTCGTCCTGGTTGCCTTTTCTCATTCTGTGGGGACCAGCCTGTGTG
GTGTGGTCTTCGCTAGCATCTCATCAGGCCTTGGGGAGGTCACCTTCCTCTCCCTCACTGCCTTCTACCCAGGGCC
GTGATCTCCTGGTGGTCCTCAGGGACTGGGGGAGCTGGGCTGCTGGGGGGCCCTGTCCTACCTGGGCCTCACCCAG
GCCGGCCTCTCCCCTCAGCAGACCCTGCTGTCCATGCTGGGTATCCCTGCCCTGCTGCTGGCCAGCTATTTCTTGTT
GCTCACATCTCCTGAGGCCCAGGACCCTGGAGGGGAAGAAGAAGCAGAGAGCGCAGCCCGGCAGCCCCTCATAA
GAACCGAGGCCCGGAGTCGAAGCCAGGCTCCAGCTCCAGCCTCTCCCTTCGGGAAAGGTGGACAGTGTTCAAG
GGTCTGCTGTGGTACATTGTTCCCTTGGTCGTAGTTTACTTTGCCGAGTATTTATTAACCAGGGACTTTTTGAACTC
CTCTTTTTCTGGAACACTTCCCTGAGTCACGCTCAGCAATACCGCTGGTACCAGATGCTGTACCAGGCTGGCGTCTT
TGCCTCCCGCTCTTCTCTCCGCTGCTGTGCGCATCCGTTTCACCTGGGCCCTGGCCCTGCTGCAGTGCCTCAACCTGG
TGTTCTGCTGGCAGACGTGTGGTTCGGCTTTCTGCCAAGCATCTACCTCGTCTTCCTGATCATTCTGTATGAGGGG
CTCCTGGGAGGCGCAGCCTACGTGAACACCTTCCACAACATCGCCCTGGAGACCAGTGATGAGCACCGGGAGTTT
GCAATGGCGGCCACCTGCATCTCTGACACACTGGGGATCTCCCTGTCGGGGGCTCCTGGCTTTGCCTCTGCATGACT\

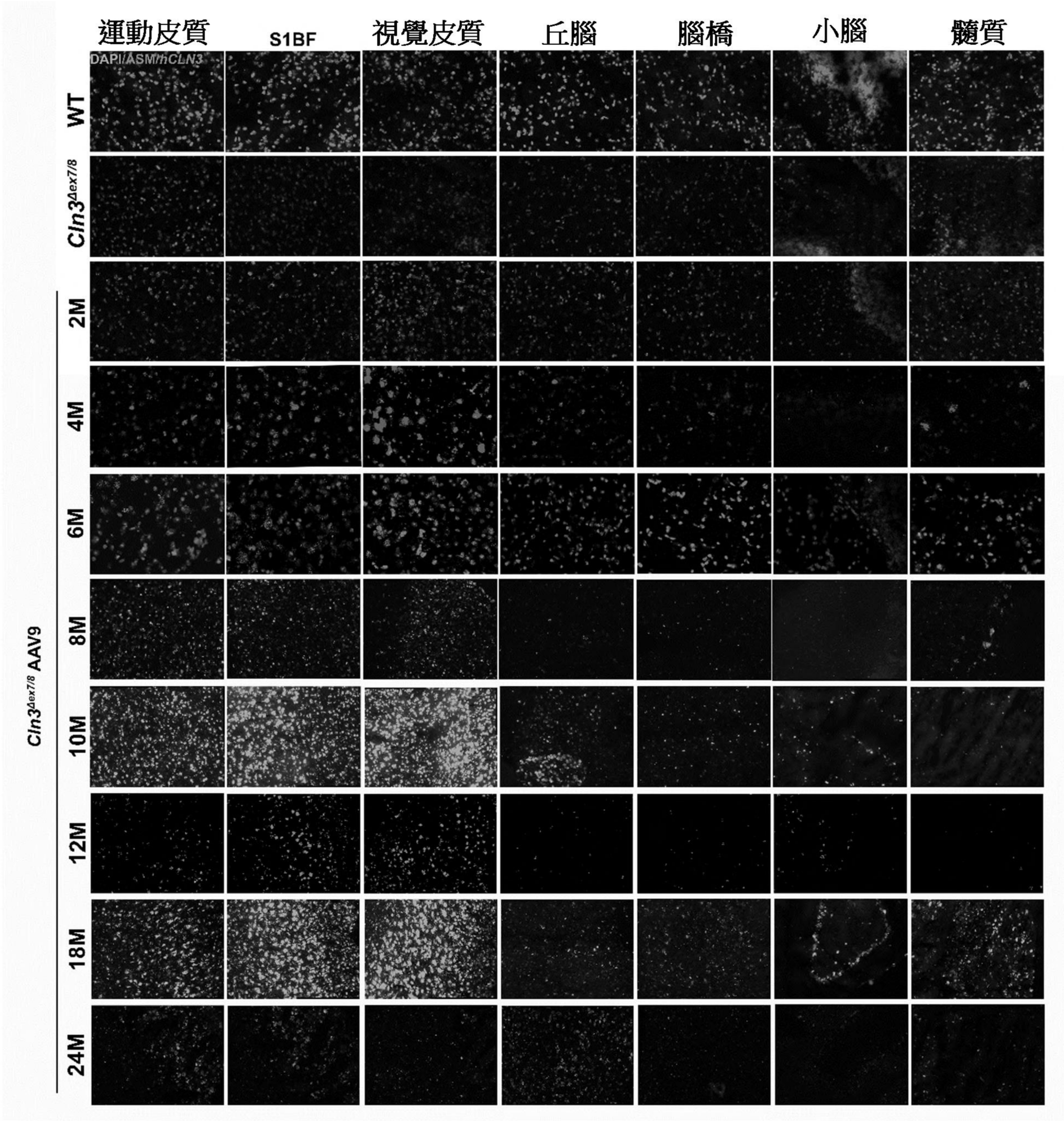
【圖15】

TCCTCTGCCAGCTCTCCTGACCTGCAGGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCC
GTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCT
GAGTAGGTGTCATTCTATTCGCATGCTGGGGAGAGATCGATCTGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCC
CTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGC
CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCGGCGATTCTCTTGTTTGCTCC
AGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTTGTAGAGACCTCTCAAAAATAGCTACCCTCTCCGGCATGAATTTATCA
GCTAGAACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACTGTCTCCGGCCTTTCTCACCCGTTTGAATCTTTACCTACA
CATTACTCAGGCATTGCATTTAAAATATATGAGGGTTCTAAAAATTTTTATCCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCC
CGCAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTTTTTGGTACAACCGATTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTT
TGCTAATTCTTTGCCTTGCCTGTATGATTTATTGGATGTTGGAATCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTG
TGCGGTATTTTACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGAC
ACCCGCCAACACTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCC
AACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGG
AGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTTACCCTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTT
TATAGGTTAATGTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGCCATAT
TCAACGGGAAACGTCGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGA
TAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACAT
GGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCACTT
CCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGAAAAACAGCGTT
CCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCTGCGCCGGTTGCAC
TCGATTCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTGCGCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAA
CGGTTTGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCA
TAACTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCCTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGG
GAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAA
CTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATA
AATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATT
TAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTG
AGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTA
ATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTT
TTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCA
CTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATA
AGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGGGGGGT
TCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGC
GCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGA
GGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATT
TTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTT
TGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGA
GCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGC

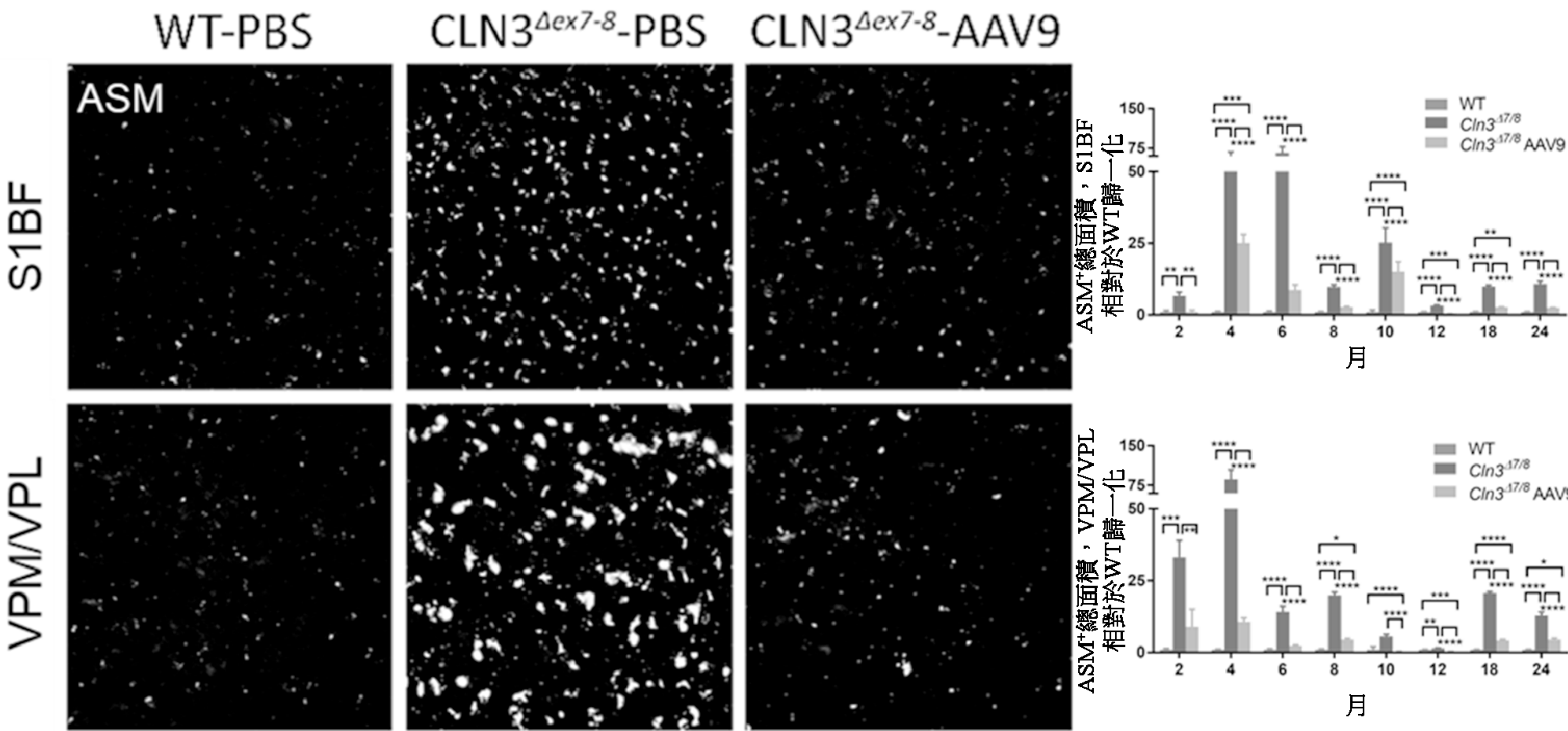
【圖15】（續）



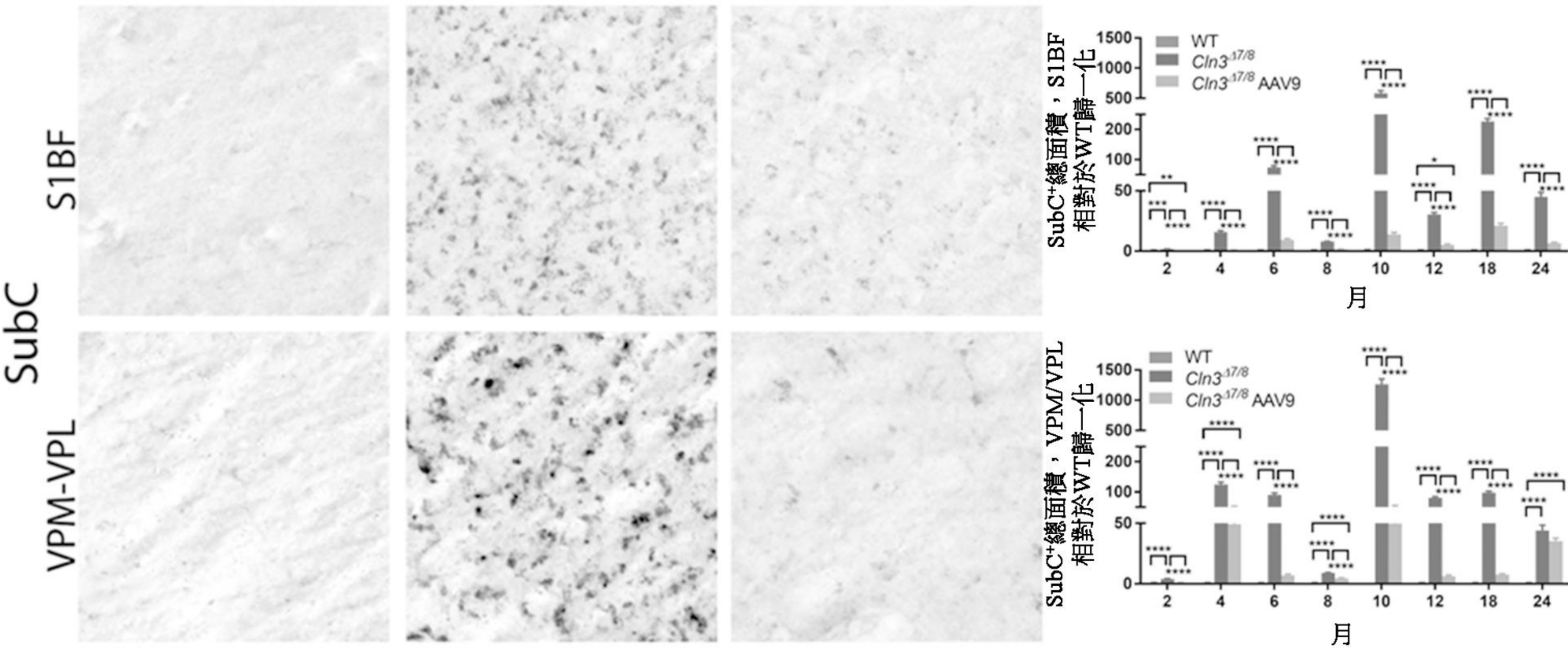
【圖16】



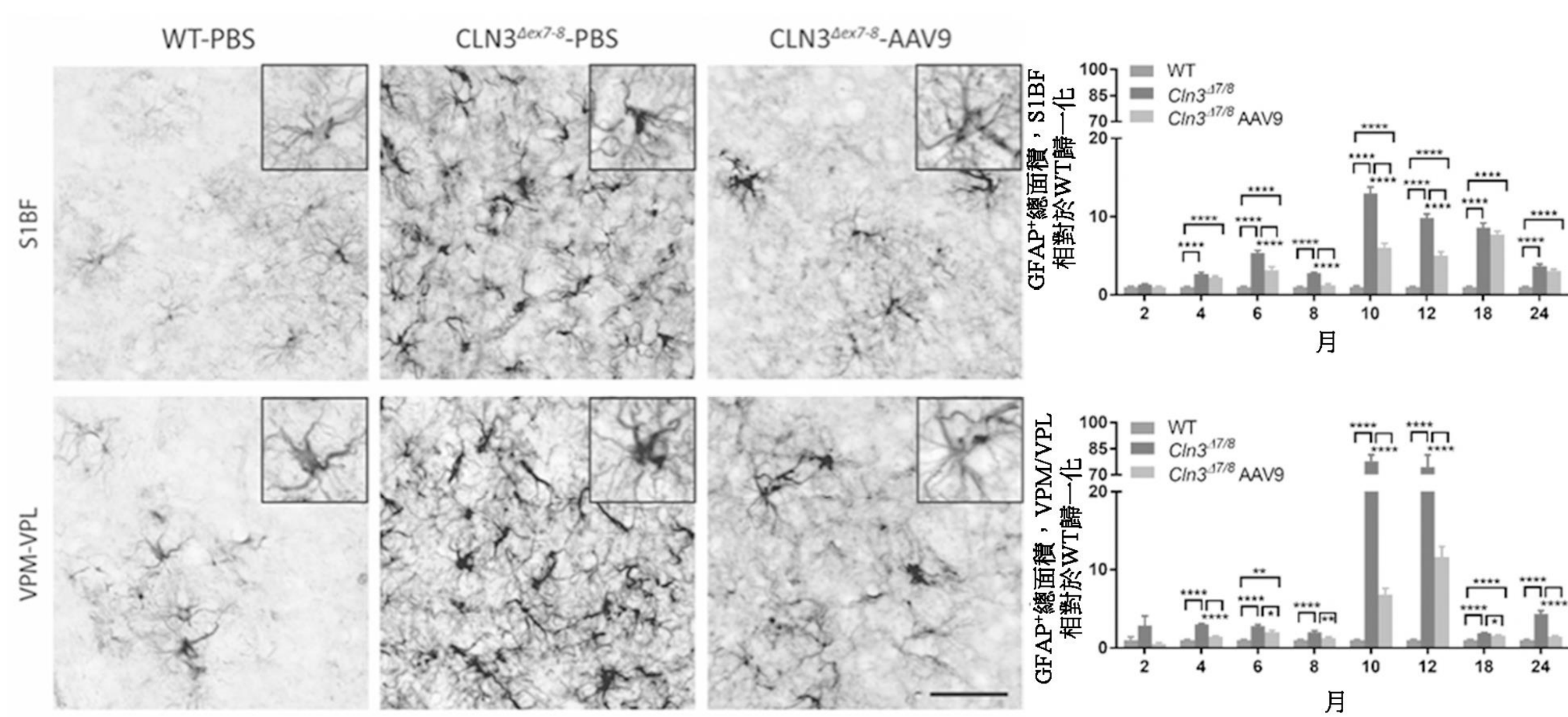
【圖17】



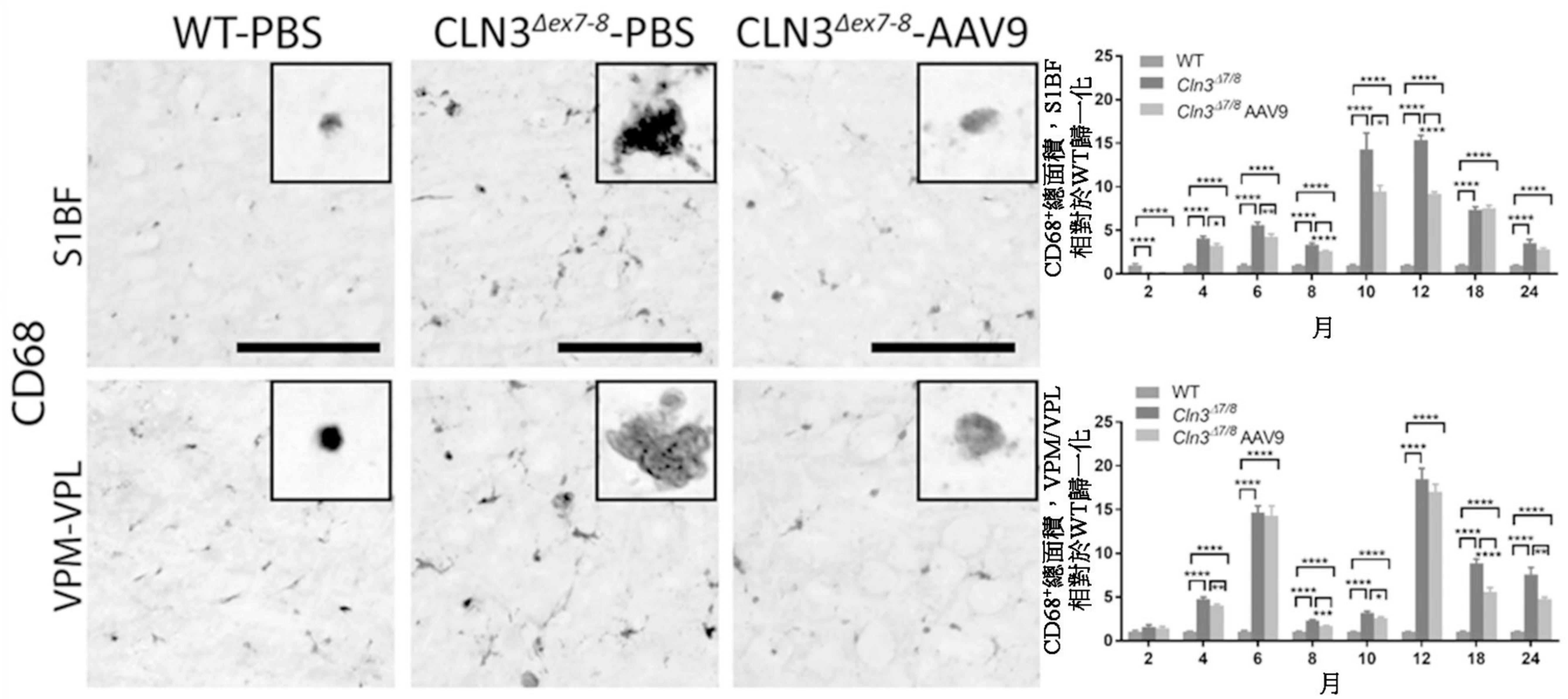
【圖18】



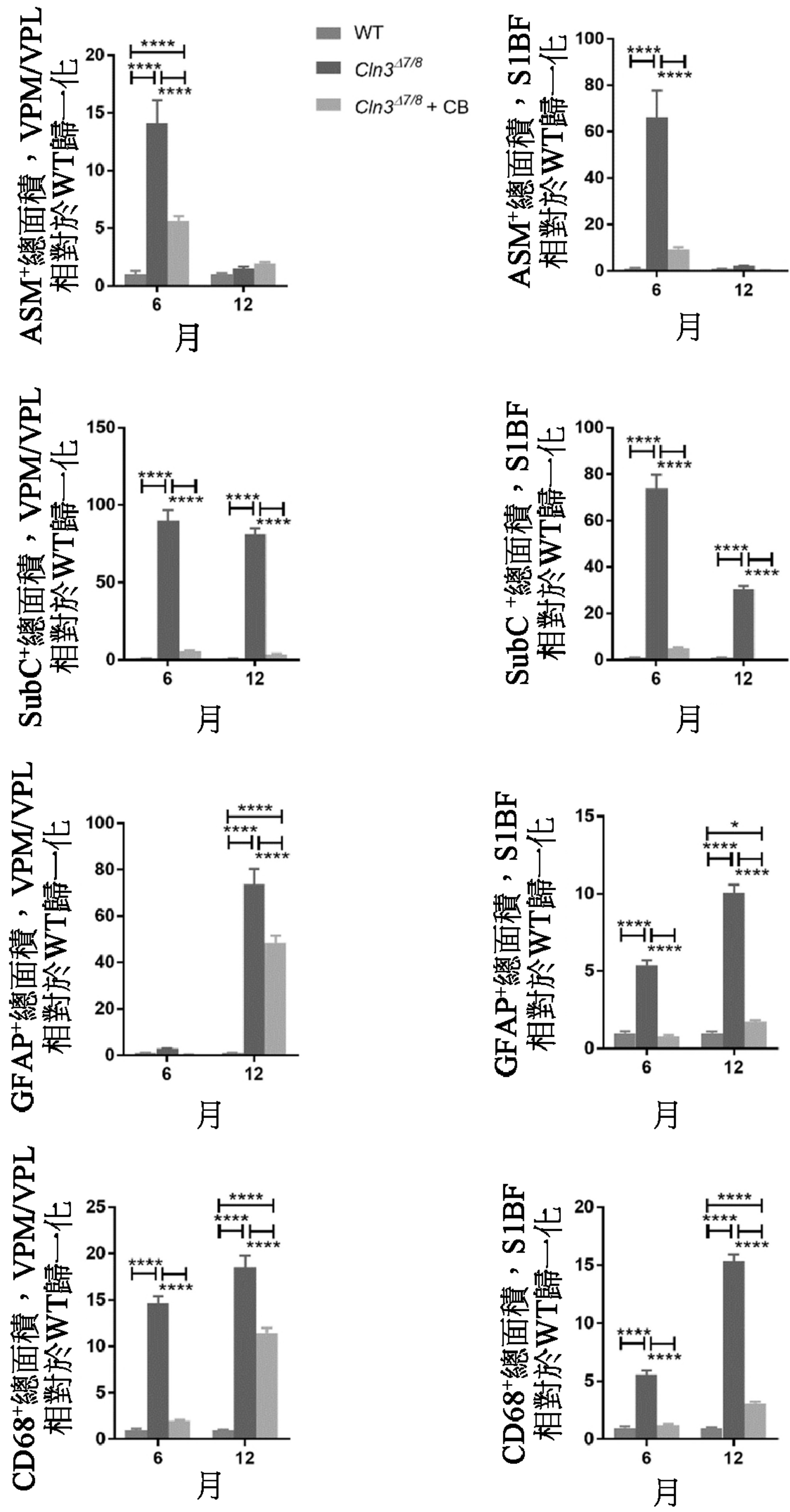
【圖19】



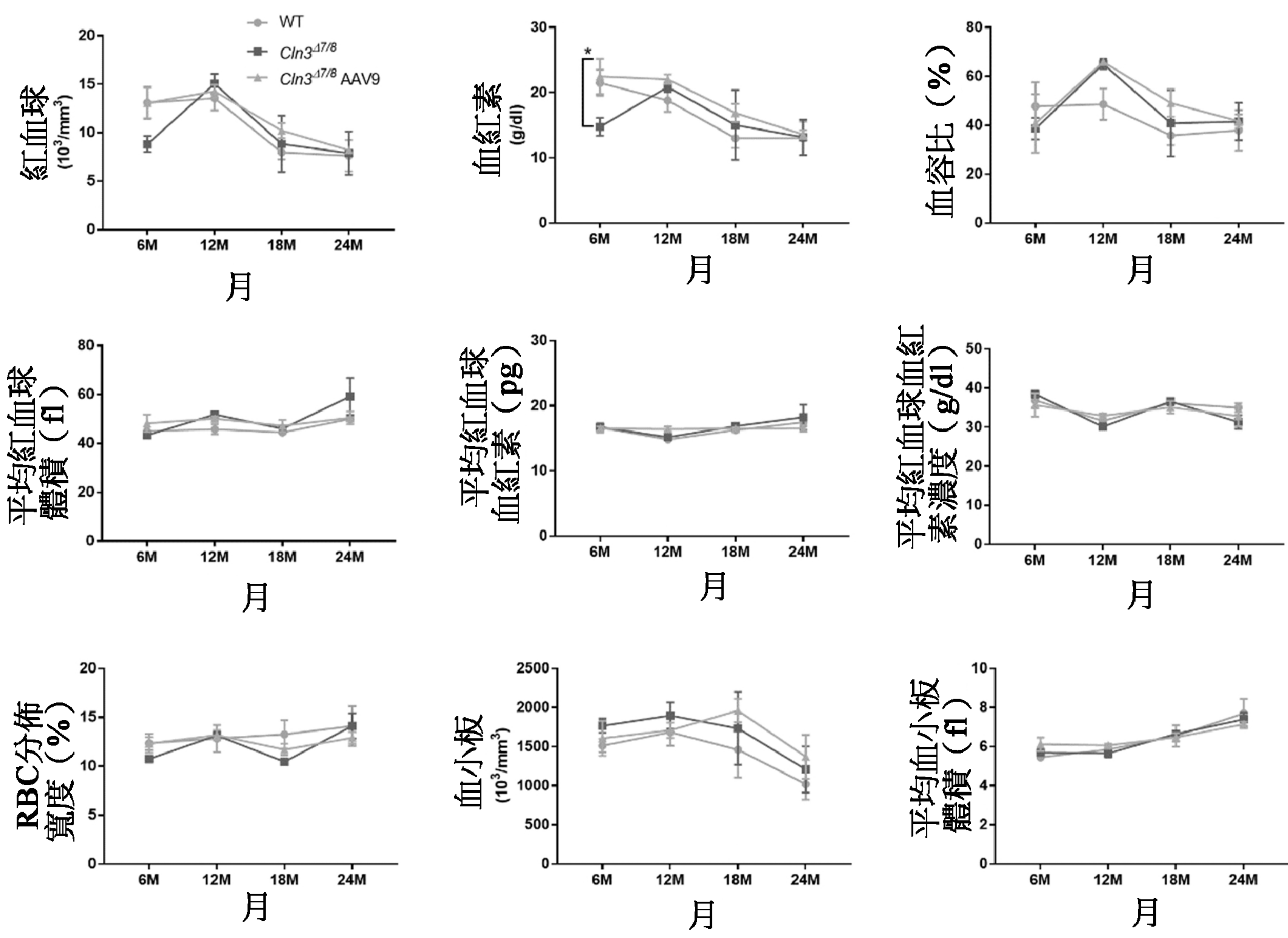
【圖20】



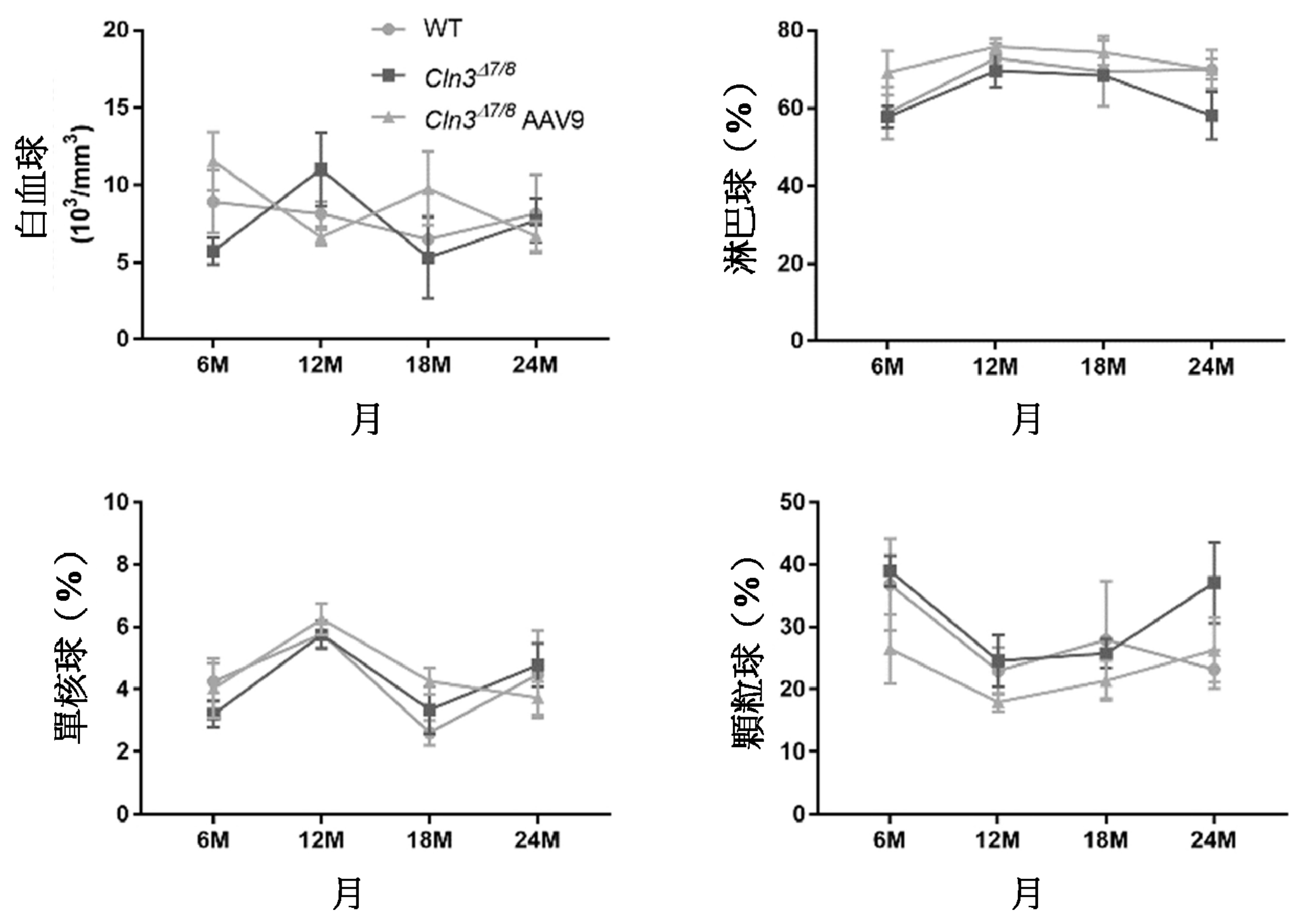
【圖21】



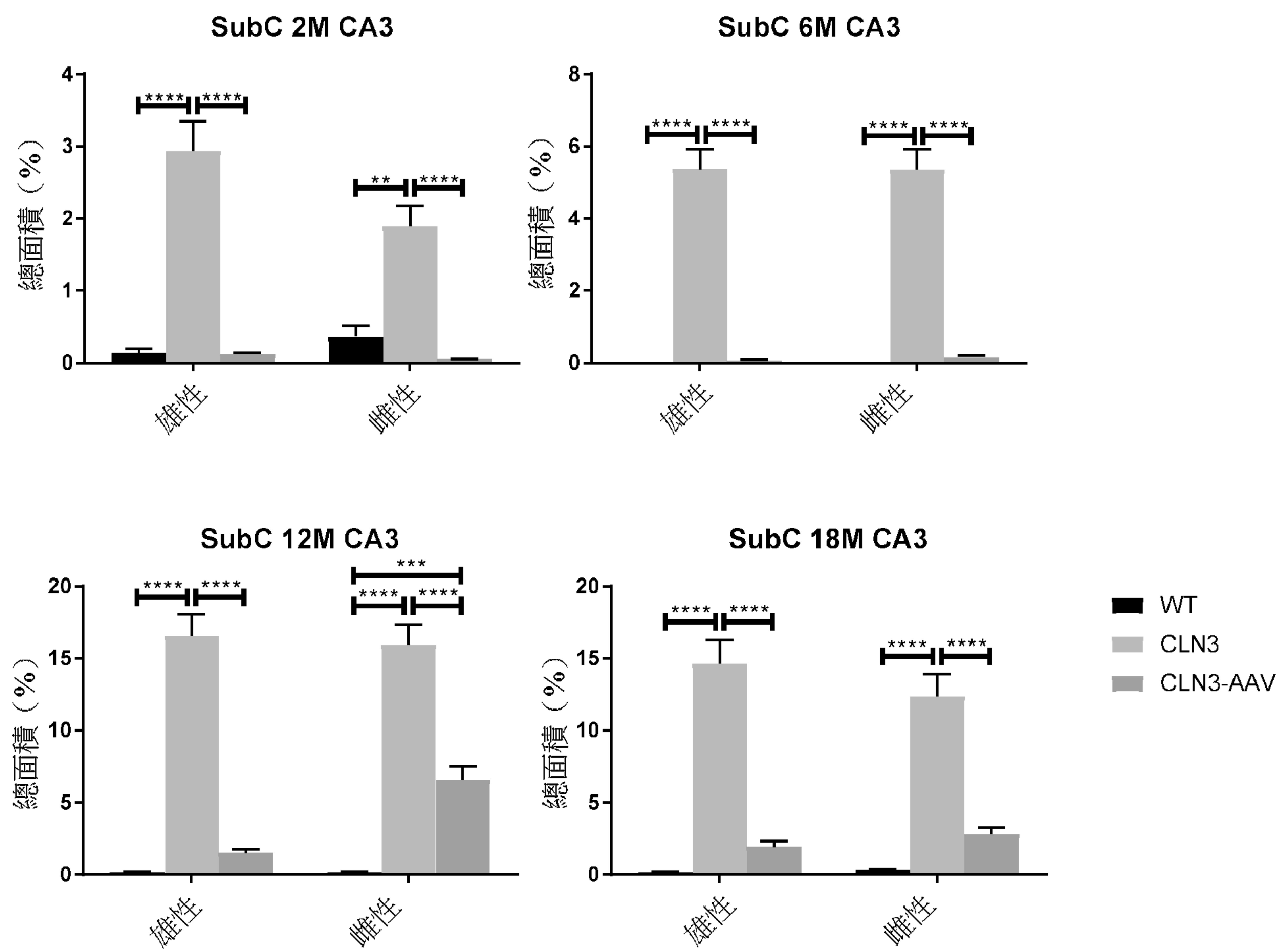
【圖22】



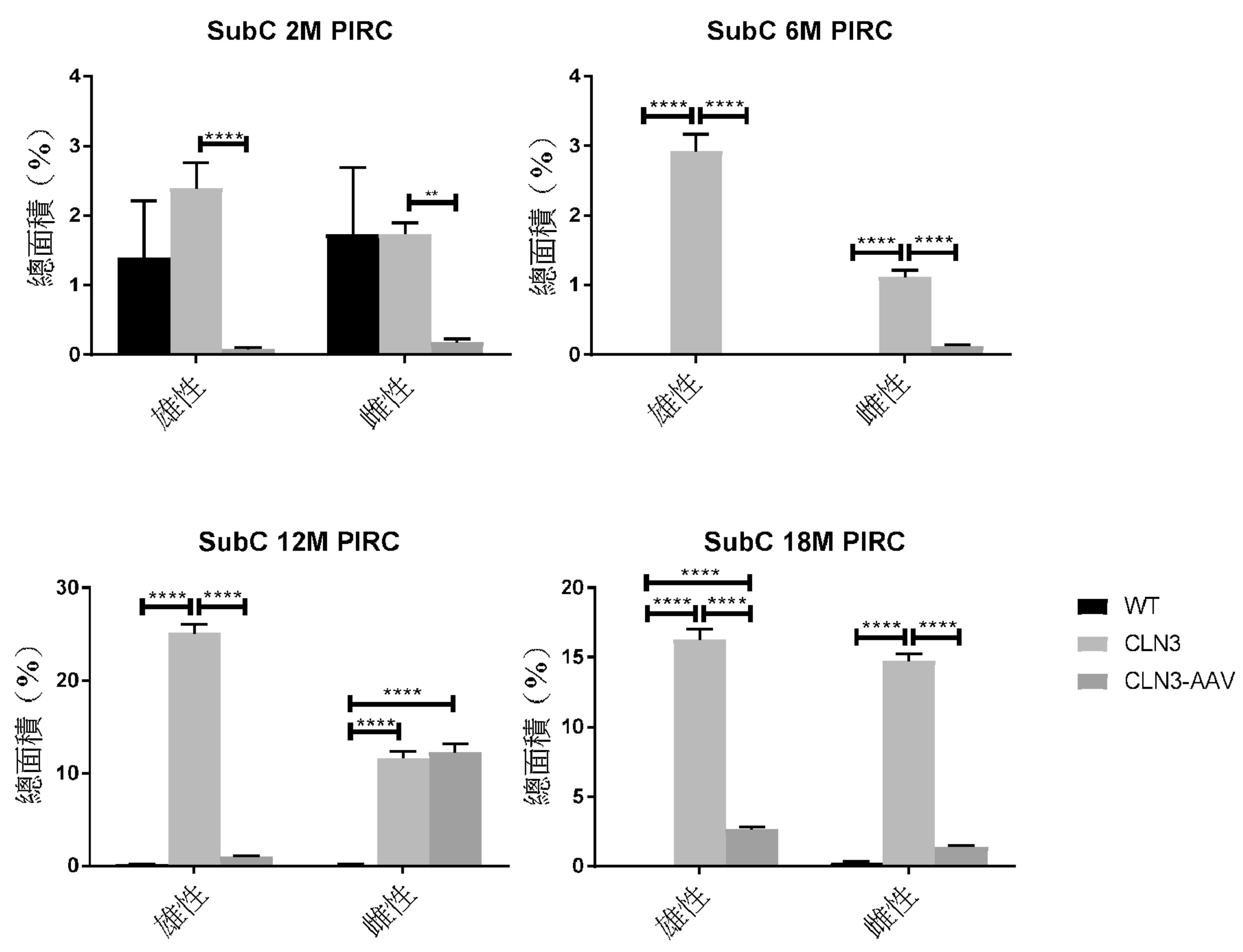
【圖23】



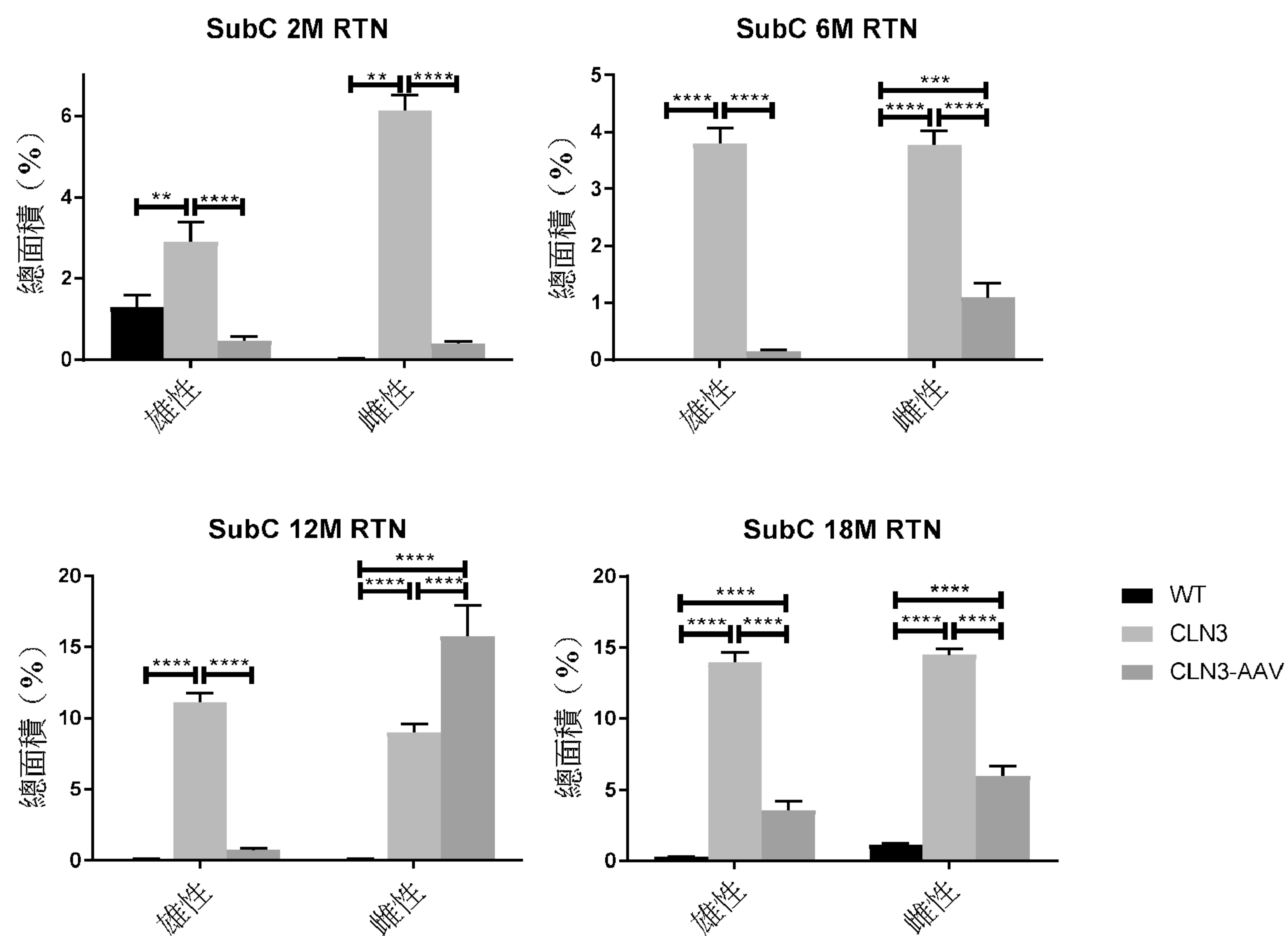
【圖24】



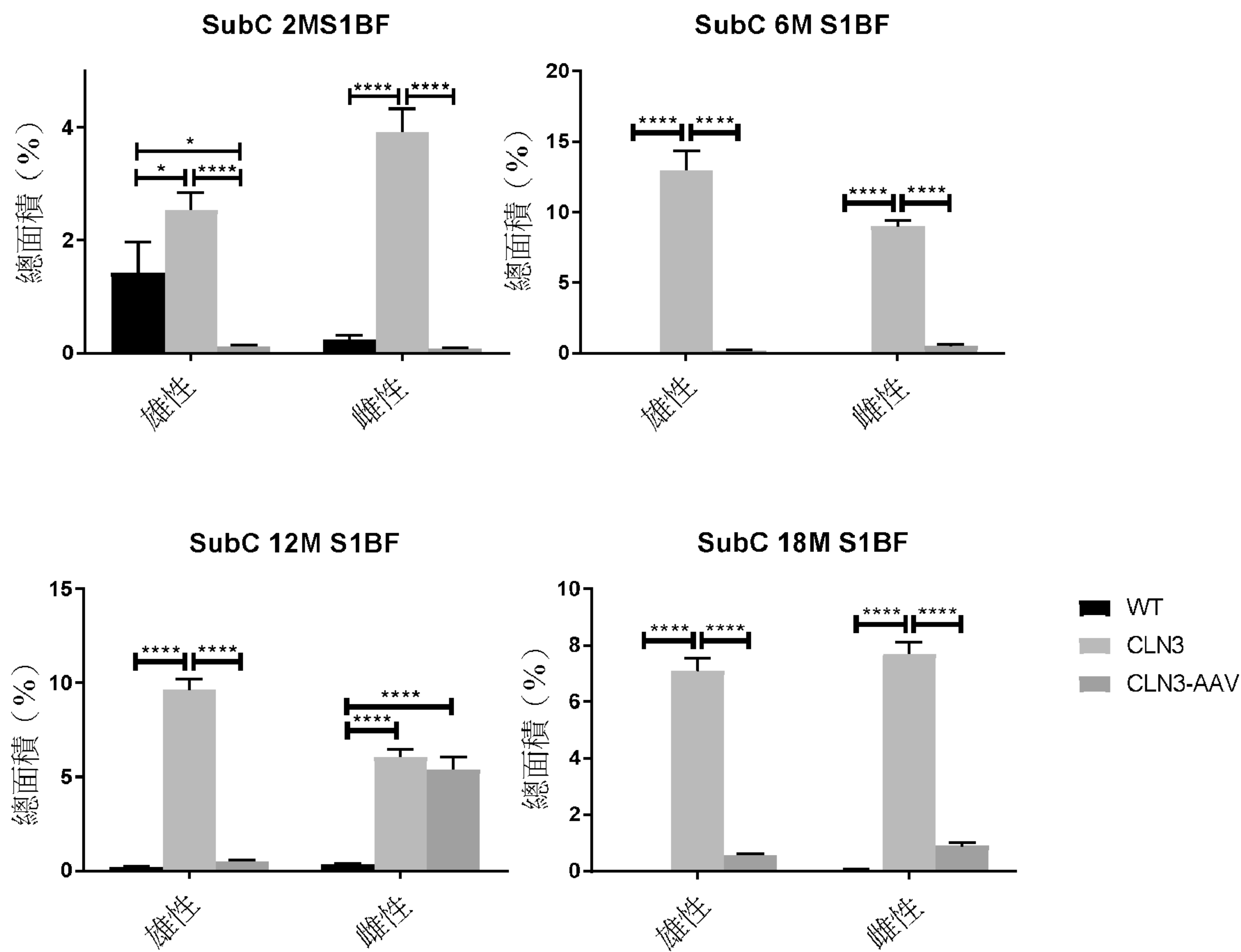
【圖25】



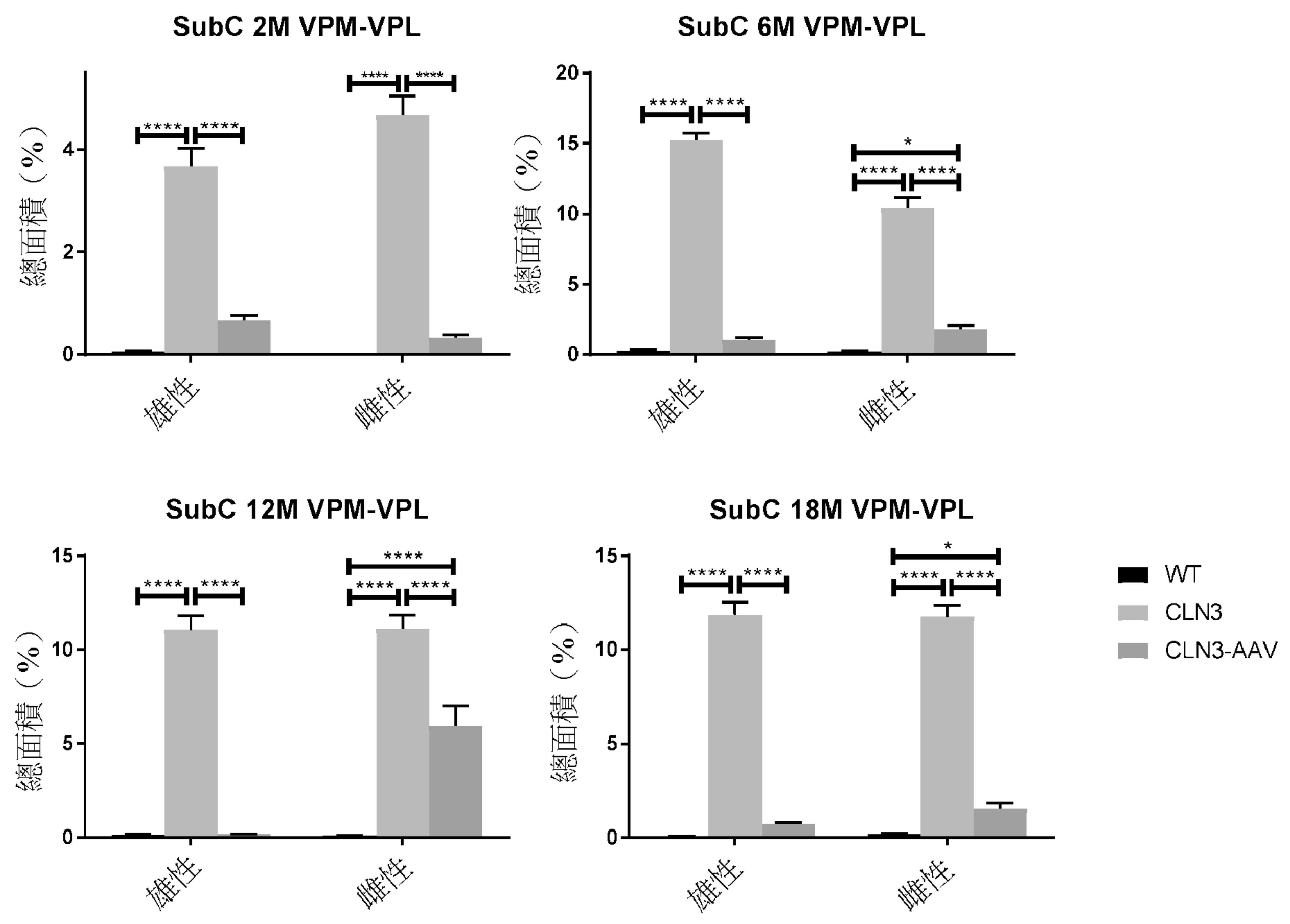
【圖26】



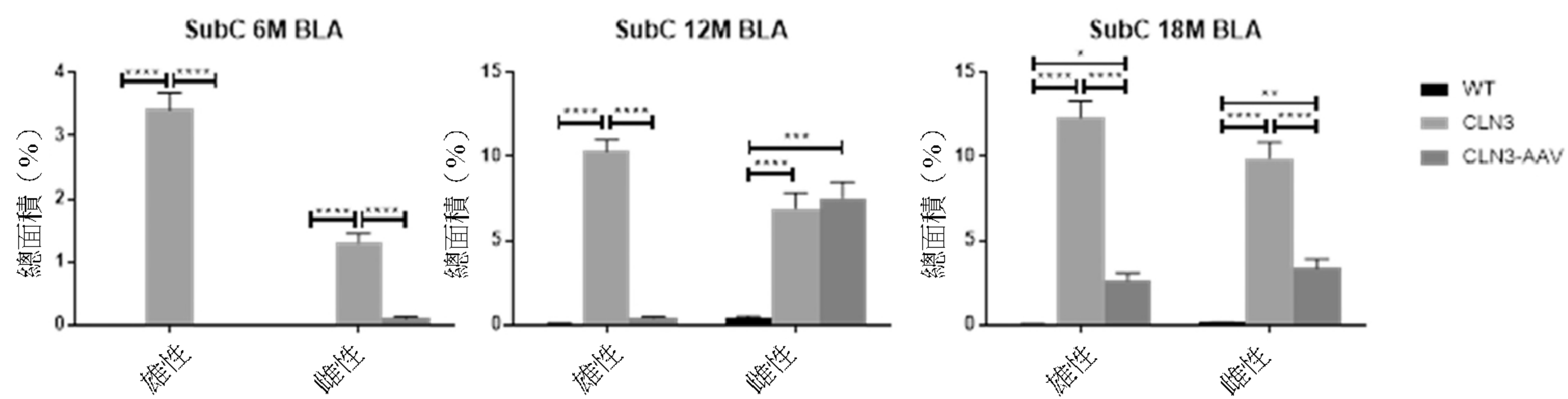
【圖27】



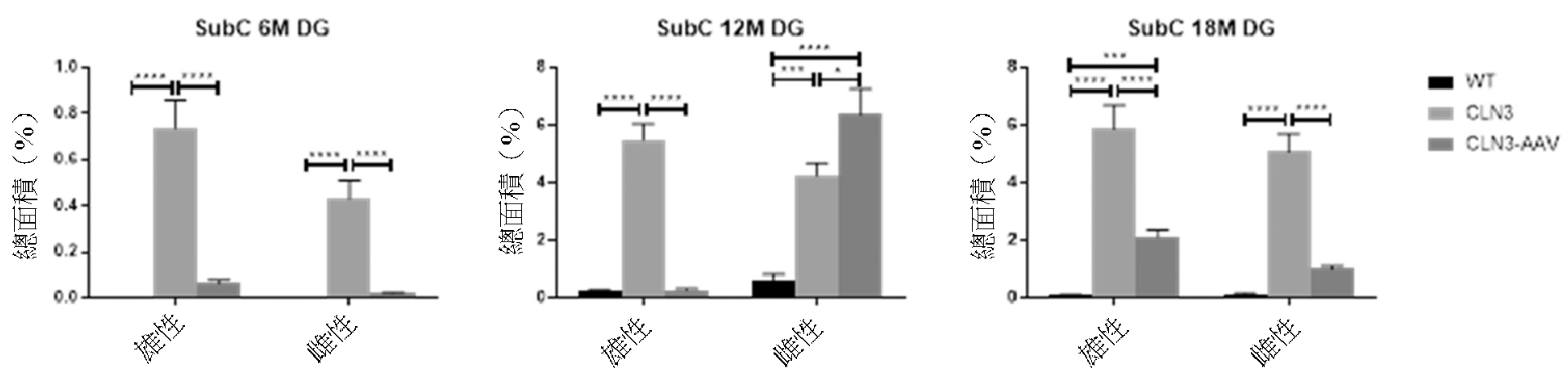
【圖28】



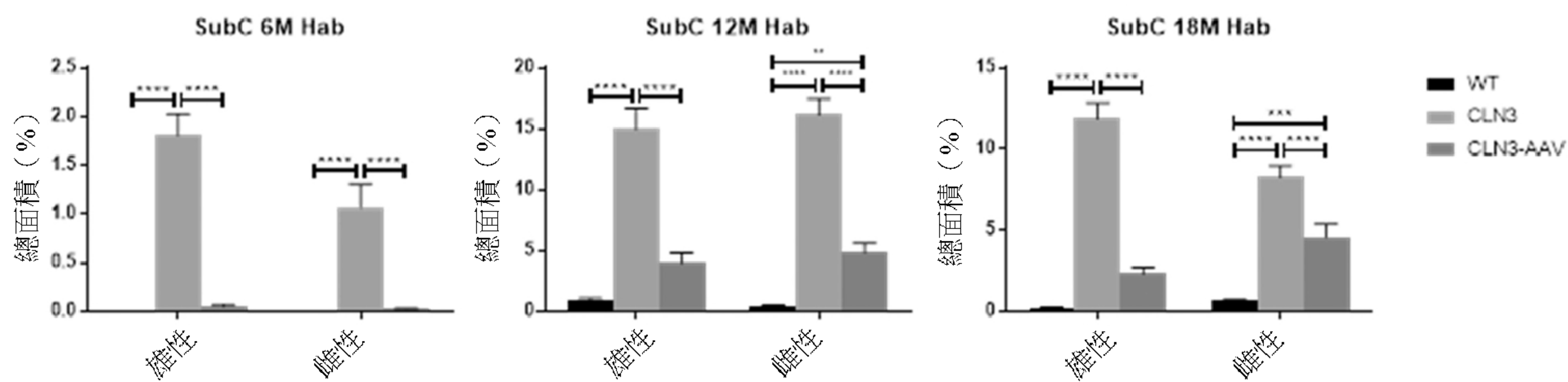
【圖29】



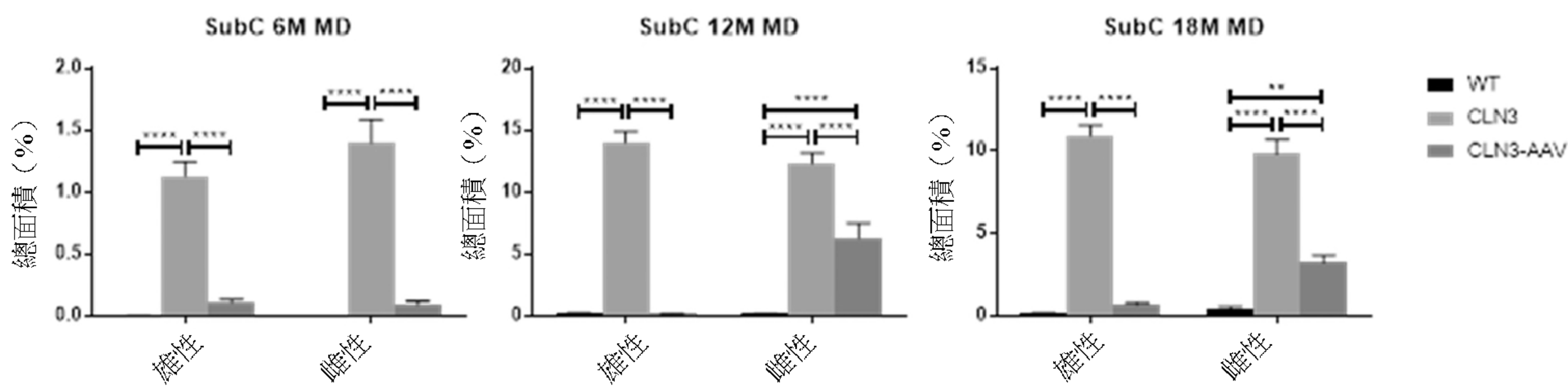
【圖30】



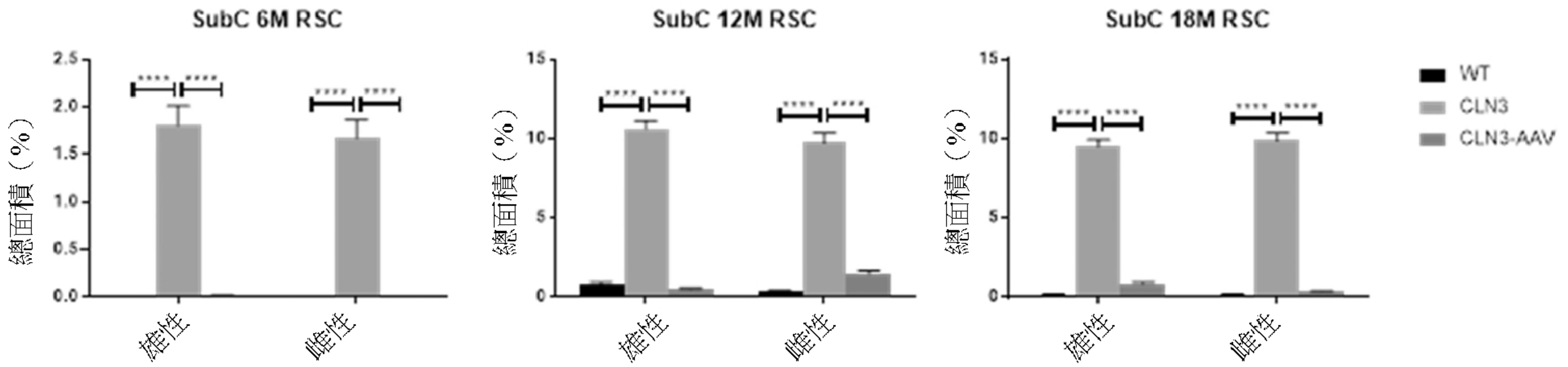
【圖31】



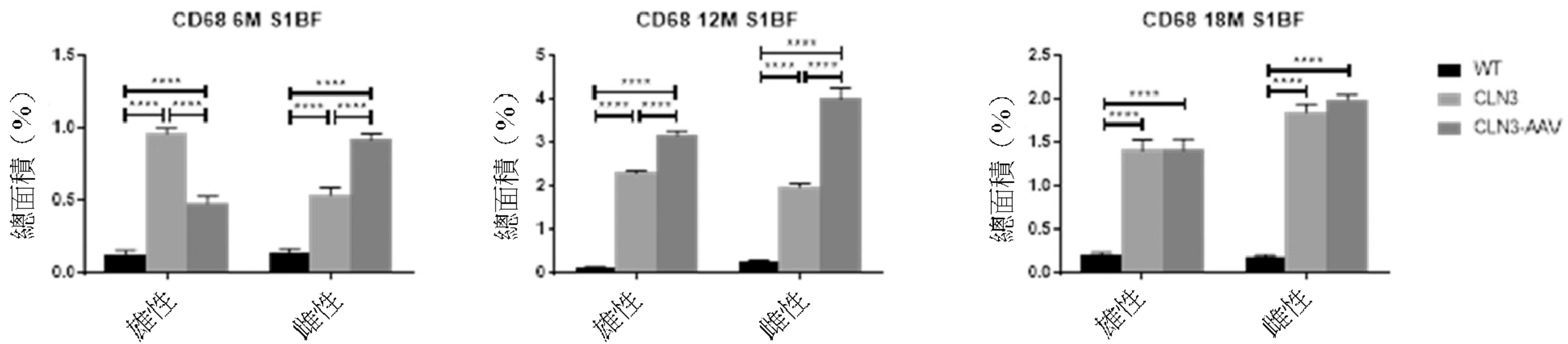
【圖32】



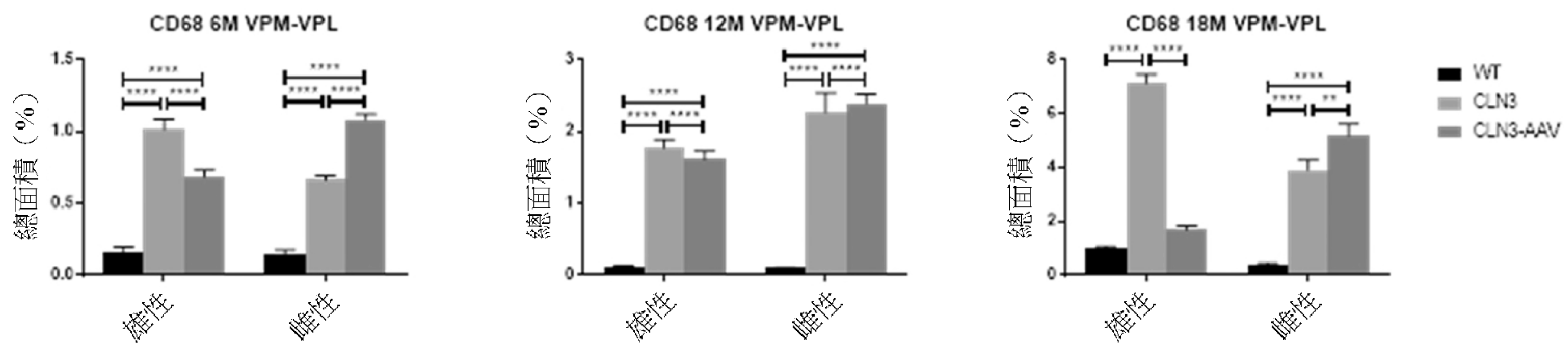
【圖33】



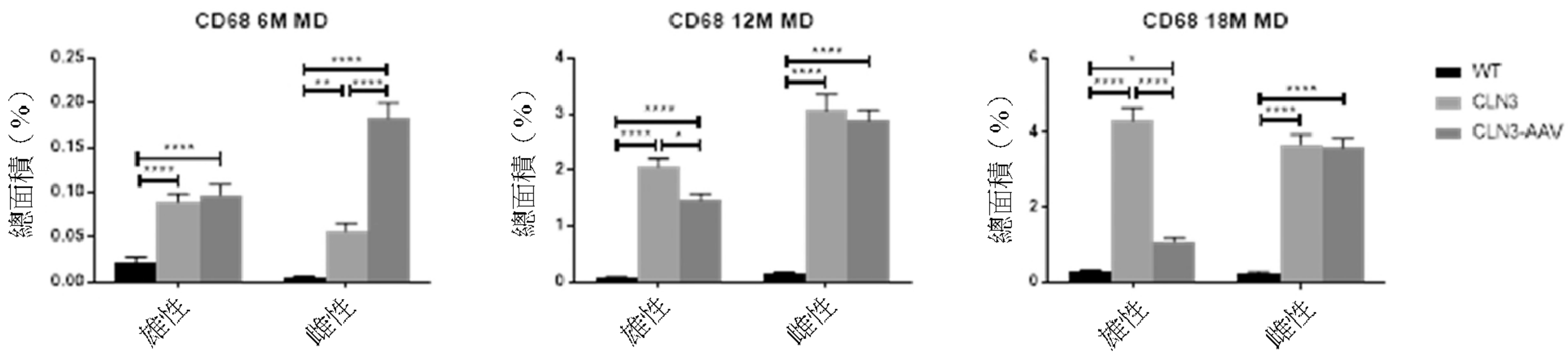
【圖34】



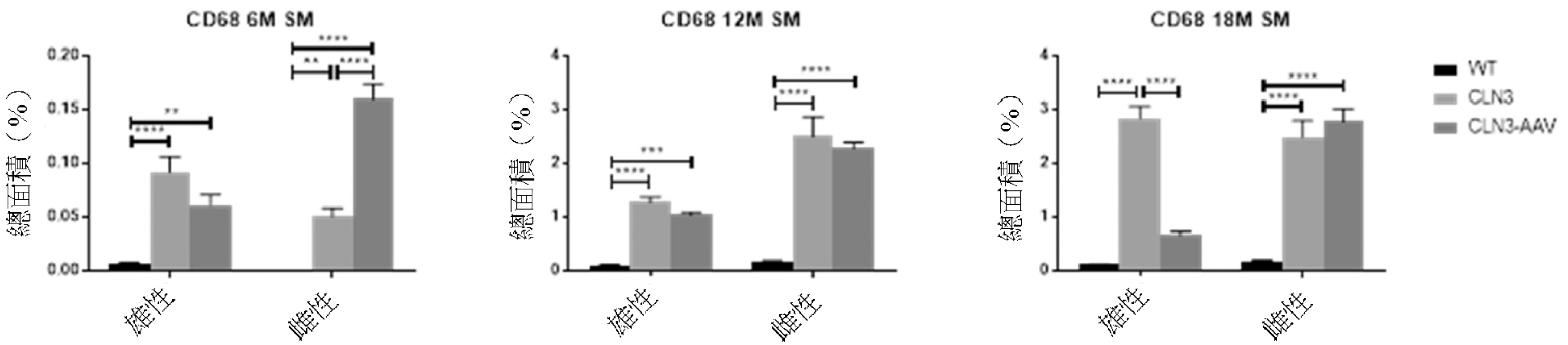
【圖35】



【圖36】



【圖37】



【圖38】